

UNIVERSITY OF HAWAII  
LIBRARY

# ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG  
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRUendet VON

J. BEHRENS      F. BOAS      A. RIPPEL

UNTER MITWIRKUNG VON

CHR. BARTHEL - STOCKHOLM · W. BAVENDAMM - DRESDEN - THARANDT · F. BOAS -  
MÜNCHEN · H. BORTELS - BERLIN · T. CASTELLI - PERUGIA · W. CUTLER - ROTHAMSTED  
V. DENK PRAG · D. FEHÉR - SOPRON · E. B. FRED - MADISON · F. FUHRMANN - GRAZ  
C. GORINI - MAILAND · J. GROENEWEGE - KOETARADJA · A. GUILLIERMOND - PARIS  
O. HAGEM - BERGEN · A. JANKE - WIEN · S. KRZEMIENIEWSKI - LEMBERG · PH. LASSEUR -  
NANCY · E. MELIN - UPPSALA · R. NILSSON - UPPSALA · A. PASCHER - PRAG · B. PEYRONEL -  
FLORENZ · O. RAHN - ITHACA · GINO DE ROSSI - PERUGIA · K. SAITO - OSAKA  
W. H. SCHOPFER - BERN · W. SCHWARTZ - KARLSRUHE · C. STAPP - BERLIN · H. TAMIYA -  
TOKIO · F. TOBLER - DRESDEN · S. WINOGRADSKY - PARIS

HERAUSGEGEBEN VON

A. RIPPEL  
GÖTTINGEN

12. BAND. 3. HEFT

MIT 17 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 15. NOVEMBER 1941)



BERLIN  
SPRINGER - VERLAG  
1941

Arch.  
Mikrobiol.

Preis RM 16.80

Das

# Archiv für Mikrobiologie

steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden sollen.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschster Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften; mit etwa 40 Bogen wird ein Band abgeschlossen.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von RM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle RM 30.— für eine Arbeit. Von der Schriftleitung angeforderte Referate werden mit RM 100.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 40 Sonderdrucke unentgeltlich. Weitere 160 Exemplare werden, falls bei Rücksendung der 1. Korrektur bestellt, gegen eine angemessene Entschädigung geliefert. Darüber hinaus gewünschte Exemplare müssen zum Bogenettopreise berechnet werden. Mit der Lieferung von Dissertationsexemplaren befaßt sich der Verlag grundsätzlich nicht; er stellt jedoch den Doktoranden den Satz zur Verfügung zwecks Fertigung der Dissertationsexemplare durch die Druckerei.

*Alle Manuskripte und Anfragen sind an den nachgenannten Herausgeber zu richten:*

*Professor Dr. A. Rippel, Göttingen, Albrechtstraße 6.*

Springer-Verlag OHG. Berlin W 9.

## 12. Band

## Inhaltsverzeichnis

## 3. Heft

	Seite
<b>Ondratschek, Karl.</b> Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen. IV. Mitteilung: Aneurin als Wachstumsfaktor für Eugleninen. Mit 1 Textabbildung.....	229
— Über den Mineralsalzbedarf heterotropher Flagellaten .....	241
<b>Melin, Elias, und Birgitta Nyman.</b> Über das Wuchsstoffbedürfnis von <i>Boletus granulatus</i> (L.) Fr. Mit 2 Textabbildungen.....	254
<b>Castelli, Tommaso.</b> Una nuova specie di <i>Saccharomyces</i> ; <i>Saccharomyces bisporus</i> . Con 5 figure nel testo .....	260
<b>Fries, Nils.</b> Über die Sporenkeimung bei einigen Gasteromyceten und mykorrhizabildenden Hymenomyceten. Mit 5 Textabbildungen...	266
<b>Rippel, August, Kurt Nabel und Werner Köhler.</b> Über Eiweißbildung durch Bakterien. V. Mitteilung: Kohlenstoff- und Stickstoffquellen für <i>Bacillus glycinophilus</i> .....	285
<b>Niethammer, A.</b> Weitere Beiträge über Verbreitung und Leben mikroskopischer Bodenpilze. Mit 4 Textabbildungen.....	312
<b>Starc, Artur.</b> Mikrobiologische Untersuchungen einiger podsoliger Böden Kroatiens .....	329

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität  
in Prag.)

# Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen.

IV. Mitteilung:

## Aneurin als Wachstumsfaktor für Eugleninen.

Von

Karl Ondratschek.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 2. Mai 1941.)

In den vorangegangenen drei Mitteilungen dieser Arbeitenreihe wurde die Aufgabe des Aneurins im Stoffwechsel verschiedener farbloser Flagellaten untersucht. Nachdem die Notwendigkeit dieses Wirkstoffes für *Chilomonaden*, *Polyblepharidineen* und *Polytomeen* aufgezeigt worden war, sollte in Fortsetzung dieser Untersuchungen der Einfluß des Vitamins B<sub>1</sub> für einige *Eugleninen* untersucht werden.

Zur Verfügung standen Reinkulturen von drei grünen (*Euglena viridis*, *E. gracilis* und *E. gracilis* var. *robusta*) und drei farblosen Arten (*Astasia longa*, *A. quartana*, *A. Chattoni*). Die grünen Arten werden seit langem im Dunkeln, also ausschließlich heterotroph gezüchtet, bei sämtlichen ist das Assimilationspigment rückgebildet, sie erscheinen farblos.

Einzelheiten über die Versuchsanstellung und ähnliches wurden in der ersten Mitteilung (Ondratschek 1940, S. 241) geschildert. Hier sei nur darauf verwiesen, daß sämtliche Versuche im Dunkeln gehalten wurden, um gegebenenfalls Versuchsfehler durch den Einfluß der Assimilation bei den grünen Arten zu vermeiden.

### Eigene Versuche und Ergebnisse.

#### 1. Einfluß der Reaktion der Nährlösung auf das Versuchsergebnis.

Als notwendige Voraussetzung für alle übrigen Versuche mußte in Vorversuchen der Einfluß der Reaktion auf die Vermehrung unserer Organismen untersucht werden. Wir verwendeten die in den vorangegangenen Mitteilungen wiederholt angegebene Nährlösung L 25a, die wir durch vorsichtigen Zusatz von n/50 HCl bzw. NaOH auf nachstehende *pH*-Stufen brachten:

4,2, 4,8, 5,1, 5,6, 6,0, 6,6, 7,1, 7,6, 8,2.

Die derart vorbehandelten Lösungen wurden zu je 100 ccm in Erlenmeyerkölbchen von 150 ccm Fassungsvermögen abgefüllt, sterilisiert und nach 24 Stunden mit einer Zellaufschwemmung von 4 bis 5 Tage alten

Kulturen zu je einem Tropfen beimpft. Nach 25 Tagen erfolgten in der üblichen Weise die Trockengewichtsbestimmungen, deren Ergebnis in Tabelle I zusammengefaßt ist.

Wir ersehen aus Tabelle I, daß eine Reaktion um  $p_H$  6,5 für alle sechs untersuchten Organismen am günstigsten wirkt (bezogen auf L 25a!). *Euglena gracilis* var. *robusta* und *Astasia longa* vermehren sich auch bei  $p_H$  6,0 sehr gut, *A. quartana* ebenso bei 7,0. Im allgemeinen muß festgestellt werden, daß das  $p_H$ -Optimum für die hier behandelten *Eugleninen* ziemlich eng begrenzt ist. Wie Tabelle I zeigt, haben Reaktionen, die sich vom Optimum verhältnismäßig wenig entfernen, bereits sehr ungünstigen Einfluß auf die Vermehrung.

Tabelle I. Einfluß der Reaktion auf das Erntetrockengewicht.  
(Mittelwerte in mg/100 ccm/25 Tage).

Arten	$p_H$ -Stufen								
	4,2	4,8	5,1	5,6	6,0	6,6	7,1	7,6	8,2
<i>Euglena viridis</i> .....	—	—	1,8	2,6	8,1	<b>12,6</b>	10,3	6,7	0,5
<i>Euglena gracilis</i> .....	—	0,8	2,5	6,8	13,9	<b>15,6</b>	12,8	8,1	1,6
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	0,3	2,0	6,3	16,7	<b>24,8</b>	<b>25,1</b>	20,1	8,8	2,6
<i>Astasia longa</i> .....	—	1,2	9,9	24,1	<b>26,0</b>	<b>25,8</b>	18,6	4,5	0,9
<i>Astasia quartana</i> .....	—	—	1,3	6,9	16,5	<b>20,1</b>	<b>19,8</b>	9,6	1,1
<i>Astasia Chattoni</i> .....	—	—	0,2	3,9	12,8	<b>25,2</b>	22,3	12,2	2,3

2. Einfluß des physiologischen Zustandes des zur Beimpfung einer Versuchslösung verwendeten Zellgemisches auf das Ergebnis.

In ähnlicher Weise wie in den vorangegangenen Mitteilungen sollte auch hier einleitend untersucht werden, welchen Einfluß der Lebenszustand des Impfmaterials auf das Versuchsergebnis nimmt. Wie bereits früher (Ondratschek 1941a) festgestellt wurde, unterschieden sich *Eugleninen* bezüglich ihrer Formvariabilität wesentlich von allen anderen bisher untersuchten Arten. Während bei anderen systematischen Gliederungen angehörenden *Flagellaten* in der Regel Zellen im Normalzustand von solchen in Degeneration befindlichen verhältnismäßig leicht zu unterscheiden sind, ändert sich bei *Eugleninen* die Zellform im Laufe der Degeneration nicht, lediglich der Grad des Reservestoffgehaltes bietet einen Hinweis auf den physiologischen Zustand der Zelle. Zur Beimpfung der eingangs erwähnten Versuche diente einerseits ein Zellgemisch, das in kurzen Abständen mehrere Male in frische Nährlösung übertragen wurde (Zellen im Normalzustand), andererseits ein Zellgemisch aus 3 Monate alten Kulturen (Zellen in Degeneration begriffen).

Die Versuche wurden in Röhrchen mit 10 ccm Nährlösung durchgeführt. In Abständen von 2 Tagen wurde die Zunahme der Zahl der Zellen im cmm festgestellt. Überraschenderweise zeigten sich hier sehr

bald andere Verhältnisse, als wir sie nach den Erfahrungen mit den früher behandelten Organismen erwartet hätten. Es zeigte sich nämlich, daß der physiologische Zustand der zur Einsaat gelangenden Zellen einen nur sehr unwesentlichen Einfluß auf die Vermehrung nimmt. Praktisch ist er belanglos, wie die in Tabelle II auszugsweise zusammengestellten Zahlen zeigen.

Tabelle II. Einfluß des Lebenszustandes auf die Zunahme der Zahl der Zellen im cmm.

Arten	Lebenszustand*	Versuchsdauer in Tagen						
		4	8	12	16	20	25	30
<i>Euglena viridis</i> .....	N	20	50	150	480	820	820	820
	D	15	35	110	360	710	750	780
<i>Euglena gracilis</i> .....	N	20	80	210	510	1000	1010	1020
	D	10	25	80	290	780	900	950
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	N	30	100	260	670	1460	1500	1500
	D	10	40	180	520	1120	1450	1460
<i>Astasia longa</i> .....	N	15	45	165	670	1220	1250	1250
	D	10	25	95	320	780	1060	1180
<i>Astasia quartana</i> .....	N	10	40	120	480	1010	1020	1020
	D	10	15	65	290	610	980	980
<i>Astasia Chattoni</i> .....	N	20	50	200	710	1200	1200	1250
	D	10	25	100	420	950	1080	1110

\* N = Normalzustand (4 Tage alte Kulturen), D = Degenerationszustand (3 Monate alte Kulturen).

Aus der eben besprochenen Versuchsreihe können wir noch ein zweites Ergebnis ersehen, das für die weitere Durchführung dieser Arbeit von Bedeutung ist. Während bisher bei allen untersuchten heterotrophen Flagellaten die Vermehrung 2 bis 3 Tage nach der Beimpfung eines Versuchs in starkem Maße eingesetzt hatte und am 8. bis 10. Tage der Versuchsdauer bereits der Höhepunkt erreicht war, sehen wir hier einen bedeutend langsameren Anstieg der Vermehrung. Erst am 20. Versuchstage werden maximale Zellzahlen im cmm bzw. Trockengewichte festgestellt. In Abb. 1 wird in etwas schematisierter Form dieser Befund durch zwei Kurven wiedergegeben.

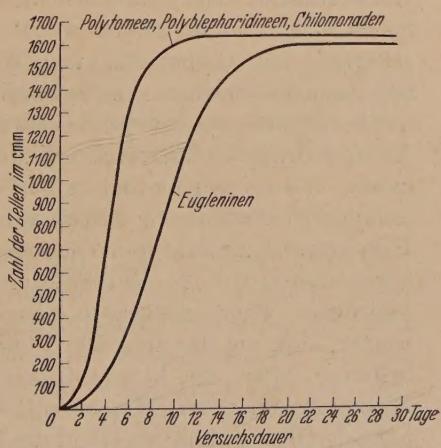


Abb. 1. Abweichender Verlauf der Vermehrung bei Eugleninen (schematisch).

### 3. Einfluß der Impfmenge auf das Versuchsergebnis.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde die übliche Nährlösung L 25a zu 100 ccm in Kölbchen sterilisiert und mit verschiedenen großen Mengen der gleichen Zellaufschwemmung beimpft. Die nach 25 Tagen durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen zeigten (Tabelle III), daß mit steigenden Impfmengen auch der Ernteertrag zunimmt. Während bei den früher untersuchten Organismen die Menge der zur Beimpfung verwendeten Zellaufschwemmung bedeutungslos war, müssen wir bei *Eugleninen* stets die gleiche, definierte Impfmenge verwenden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Die folgenden Versuche werden durchwegs mit 0,03 ccm einer Organismenaufschwemmung von rund 50 Zellen im cmm auf 250 ccm Versuchslösung beimpft.

Tabelle III.

### Einfluß der Impfmenge auf die Trockensubstanzbildung. (Mittelwerte in mg/100 ccm/25 Tage.)

Arten	Impfmenge					
	0,01 ccm	0,02 ccm	0,05 ccm	0,1 ccm	0,3 ccm	0,5 ccm
<i>Euglena viridis</i> .....	12,9	13,5	16,9	18,5	22,0	22,5
<i>Euglena gracilis</i> .....	15,0	15,8	20,2	22,7	24,5	26,3
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	26,2	27,4	29,1	33,6	34,8	37,1
<i>Astasia longa</i> .....	24,6	26,2	27,5	29,0	31,2	34,7
<i>Astasia quartana</i> .....	23,8	25,1	28,6	29,8	33,0	35,2
<i>Astasia Chattoni</i> .....	20,4	22,5	25,4	26,7	28,2	30,5

### 4. Vorversuche über den Einfluß von Aneurin auf die Vermehrung.

Die ersten Versuche dieser Reihe sollten sich mit der Feststellung der Notwendigkeit oder Entbehrlichkeit von Aneurin für *Eugleninen* befassen. Zu diesem Zweck wurde die Nährlösung L 25a durch Ausschütteln mit Carboraffin von Wirkstoffen gereinigt und zum Teil mit Aneurin versehen. Die beimpften Versuche zeigten nach 25 Tagen nur bei *Euglena gracilis* var. *robusta* ein eindeutiges Ergebnis, alle anderen Arten vermehrten sich auch mit Aneurinzusatz sehr schlecht. Der Gedanke, daß es sich hierbei in ähnlicher Weise wie in der dritten Mitteilung bei *Polytomeen* aufgezeigt worden war, um einen Mangel an Pseudowachstumsfaktoren (Spurenelementen) handeln könne, bot die Veranlassung für die Durchführung etlicher Versuchsreihen mit verschiedenen Spurenelementen. In der Hauptsache konnte auch hier wieder Zink als das fehlende Element nachgewiesen werden. Einzelheiten werden, wie bereits früher angekündigt, in einer besonderen Mitteilung über den Mineralsalzbedarf heterotropher Flagellaten behandelt. Hier soll nur an Hand der Tabelle IV aufgezeigt werden, welche vermehrungsfördernde Bedeutung dem Zink zukommt.

Tabelle IV. Einfluß von Zink auf die Trockensubstanzbildung.  
(Mittelwerte in mg/250 ccm/25 Tage.)

Arten	Nährlösungen			
	unbehandelte L 25 a	mit Carboraffin ausgeschüttelt L 25 a		
		ohne Zusatz	mit Aneurin	mit Aneurin und Zn
<i>Euglena viridis</i> .....	49,8	0,2	1,8	50,1
<i>Euglena gracilis</i> .....	61,2	0,2	2,5	60,9
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	80,6	1,2	78,6	81,2
<i>Astasia longa</i> .....	78,9	0,3	1,4	80,2
<i>Astasia quartana</i> .....	66,5	0,1	1,2	67,0
<i>Astasia Chattoni</i> .....	76,7	0,5	1,6	76,6

Sämtliche in Tabelle V und den folgenden behandelten Versuche wurden daher mit  $10^{-8}\%$  Zink versehen.

### 5. Die Bedeutung von Aneurin für die Trockensubstanzbildung mit verschiedenen Stickstoffquellen.

Zur Verwendung gelangten die nachstehenden Nährlösungen, die derart bereitet wurden, daß zu einer Grundlösung von 0,01 %  $MgSO_4$ , 0,01 %  $K_2HPO_4$ , 0,001 %  $CaCl_2$  und 0,0001 %  $FeCl_3$  die folgenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zugesetzt wurden:

Nährlösung A: 0,2 % Na-Acetat und 0,1 % Pepton Vaillant;	$pH$ 6,5
„ B: 0,2 % „ „ 0,1 % N als Glykokoll;	$pH$ 6,6
„ C: 0,2 % „ „ 0,1 % N „ Asparagin;	$pH$ 6,5
„ D: 0,2 % „ „ 0,1 % N „ $NH_4NO_3$ ;	$pH$ 6,7
„ E: 0,2 % „ „ 0,1 % N „ $KNO_3$ ;	$pH$ 6,5
„ F: 0,2 % „ „ 0,1 % N „ $NH_4Cl$ ;	$pH$ 6,7
„ G: 0,2 % $NH_4$ -Acetat;	$pH$ 6,6

Die Konzentration der einzelnen Stickstoffquellen wurde mit Ausnahme des Pepton Vaillant so gewählt, daß in allen Fällen die gleiche Menge an N zugesetzt wurde. Die Versuche geschahen durchwegs mit 250 ccm Nährlösung, wobei durchwegs  $10^{-8}\%$  Zink und mit Ausnahme der Kontrollen  $10^{-4}\%$  Aneurin zugesetzt wurden.

Die Trockengewichtsbestimmungen hatten das folgende Ergebnis:

Nährlösung A (Pepton Vaillant als Stickstoffquelle): Die erläuternden Zahlen sind in Tabelle V zusammengestellt. Das nicht vorbehandelte Pepton Vaillant bietet auch für *Eugleninen* genügend Wirkstoffe, der Unterschied in der Größe der Ernteerträge der aneurinhaltigen und aneurinfreien Kulturversuche ist unbeträchtlich. Bei Verwendung eines durch Ausschütteln mit Carboraffin von Wirkstoffen befreiten Peptons zeigt sich bei Vorhandensein von Zink eine kräftige Aneurinwirkung.

Tabelle V. Trockensubstanzbildung bei Pepton Vaillant als Stickstoffquelle.  
(Mittelwerte in mg/250 ccm/25 Tage.)

Arten	Unbehandeltes Pepton			Mit Carboraffin ausgeschütteltes Pepton		
	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor
<i>Euglena viridis</i> .....	48,6	47,2	1,03	48,5	0,8	60,6
<i>Euglena gracilis</i> .....	60,2	59,6	1,01	59,3	1,0	59,3
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	80,2	80,0	1,00	81,0	1,3	62,3
<i>Astasia longa</i> .....	79,8	76,5	1,04	80,2	1,2	66,8
<i>Astasia quartana</i> .....	65,9	63,2	1,04	65,1	1,1	59,2
<i>Astasia Chattoni</i> .....	77,5	75,4	1,03	75,8	1,2	63,3

Nährösung B und C (Aminosäuren als Stickstoffquellen): In Tabelle VI sind die wichtigsten Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmungen zusammengestellt. In den früheren Mitteilungen konnte gezeigt werden, daß die normale Handelsware der beiden Aminosäuren genügend Wirkstoffe besitzt, um die Vermehrung gewisser farbloser Flagellaten zu ermöglichen. In der vorliegenden Versuchsreihe konnte dieser Befund auch für *Eugleninen* als gültig aufgezeigt werden. Werden hingegen besonders gereinigte Präparate verwendet, dann ist die Aneurinwirkung, wie aus der Berechnung der Vermehrungsfaktoren (um 100) hervorgeht, beträchtlich.

Tabelle VI.  
Trockensubstanzbildung bei Aminosäuren als Stickstoffquellen.  
(Mittelwerte in mg/250 ccm/22 Tage.)

Arten	Glykokoll			Asparagin		
	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor
<i>Euglena viridis</i> .....	45,9	0,4	114,9	46,2	0,4	111,5
<i>Euglena gracilis</i> .....	60,2	0,5	112,2	58,6	0,6	97,6
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	78,6	0,7	112,1	75,8	0,8	94,7
<i>Astasia longa</i> .....	78,2	0,7	111,8	78,5	0,8	98,1
<i>Astasia quartana</i> .....	66,1	0,6	110,1	65,3	0,7	93,4
<i>Astasia Chattoni</i> .....	75,8	0,7	108,2	78,6	0,8	98,2

Nährösung D ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als Stickstoffquelle): In Tabelle VII sind die Erntegewichte und die zugehörigen Faktoren zusammengestellt. Die vorliegenden Versuche zeigten, daß sämtliche untersuchten *Eugleninen* ihren Stickstoffbedarf mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als N-Quelle decken können. Die Aneurinwirkung ist hier besonders deutlich bemerkbar.

Nährösung E und F ( $\text{KNO}_3$  bzw.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Stickstoffquellen): Die Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmung zeigt Tabelle VIII. Die Versuchsreihe zeigt, daß die drei untersuchten *Euglena*-Arten Ammon- und Nitratstickstoff gleich gut auswerten

Tabelle VII.

Trockensubstanzbildung bei  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als Stickstoffquelle.  
(Mittelwerte in mg/250 ccm/25 Tage.)

Arten	Mit Aneurin	Ohne Aneurin	Faktor
<i>Euglena viridis</i> .....	50,2	0,4	125,6
<i>Euglena gracilis</i> .....	59,8	0,5	119,8
<i>Euglena gracilis var. robusta</i> .....	76,8	0,6	127,8
<i>Astasia longa</i> .....	80,2	0,6	133,3
<i>Astasia quartana</i> .....	65,6	0,5	131,1
<i>Astasia Chattoni</i> .....	75,8	0,6	126,7

Tabelle VIII. Trockensubstanzbildung bei Ammon- und Nitratstickstoff als Stickstoffquellen.

(Mittelwerte in mg/250 ccm/23 Tage.)

Arten	Ammonstickstoff			Nitratstickstoff		
	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor
<i>Euglena viridis</i> .....	40,8	0,4	102,0	36,8	0,4	92,0
<i>Euglena gracilis</i> .....	45,6	0,5	91,2	38,0	0,4	95,0
<i>Euglena gracilis var. robusta</i> .....	68,3	0,7	97,6	56,2	0,6	93,7
<i>Astasia longa</i> .....	72,5	0,7	103,6	7,3	—	—
<i>Astasia quartana</i> .....	58,6	0,6	97,3	6,2	—	—
<i>Astasia Chattoni</i> .....	68,9	0,7	98,7	7,2	—	—

können, während die *Astasia*-Arten üppige Vermehrung nur mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zeigen. In aneurinhaltigen Nährösungen können sie in bescheidenem Maße auch  $\text{KNO}_3$  verwenden.

Nährösung G (Ammonacetat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle): Tabelle IX gibt eine Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse. Wie bereits früher (Ondratschek 1940, S. 251) angegeben wurde, ist Ammonacetat nur unter besonderen Vorsichtsmaßregeln verwertbar. Werden die in der angegebenen Arbeit im einzelnen auseinandergesetzten Bedingungen eingehalten, so vermögen auch unsere

Tabelle IX. Trockensubstanzbildung bei Ammonacetat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.

(Mittelwerte in mg/250 ccm/25 Tage.)

Arten	Übliches Präparat			Mit zusätzlicher N-Quelle		
	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor	mit Aneurin	ohne Aneurin	Faktor
<i>Euglena viridis</i> .....	30,4	0,4	76,0	48,2	0,4	120,5
<i>Euglena gracilis</i> .....	36,0	0,4	90,0	55,6	0,5	111,2
<i>Euglena gracilis var. robusta</i> .....	45,9	0,6	76,5	75,3	0,6	125,5
<i>Astasia longa</i> .....	57,6	0,7	82,3	75,8	0,7	108,3
<i>Astasia quartana</i> .....	42,5	0,5	85,0	60,5	0,5	121,0
<i>Astasia Chattoni</i> .....	39,4	0,5	78,8	71,8	0,6	119,7

*Eugleninen* ihren C- und N-Bedarf aus dem Ammonacetat zu decken, allerdings bleiben die Ernteerträge hinter den bisher erzielten zurück. Wie in der letzten Mitteilung bei *Polytomeen* (Ondratschek 1941, c) aufgezeigt werden konnte, hat dies seine Ursache in dem etwas zu geringen Stickstoffgehalt des Ammonacetats. Wird der Stickstoff in entsprechendem Maße (s. die oben angegebene Arbeit) zusätzlich geboten, dann werden normale Ernten hervorgebracht.

#### 6. Untersuchung der Beziehungen zwischen der Konzentration der C- und N-Quelle und der Trockensubstanzbildung.

Die weiter oben angegebene Nährlösung D wurde für die einzelnen Versuchsgruppen derart abgeändert, daß jeweils ein Bestandteil in seiner Konzentration variiert wurde. In der folgenden Besprechung der Versuchsergebnisse wird der Übersichtlichkeit halber nur von den wichtigsten Ergebnissen ein Mittelwert eingeführt.

Na-Aacetatkonzentration und Ernteertrag: Tabelle X gibt einige der gefundenen Werte wieder. Der Acetatgehalt der Lösung D wurde von 0,001 bis 0,1 % variiert. Wie die genannte Tabelle zeigt, tritt die erste, quantitativ noch schwer zu erfassende Vermehrung bei 0,025 % Natriumacetat ein, also bei einer bedeutend höheren Konzentration als dies bei den bisher untersuchten Flagellaten der Fall war. Durch steigende Konzentration nehmen auch die jeweiligen Erntegewichte zu, wobei die Zunahme von 0,1 % an nur sehr gering ist. Ein Absinken der Erträge mit Konzentrationen über 0,25 % Acetat, wie dies bei anderen *Flagellaten* der Fall ist, tritt hier nicht ein.

Tabelle X. Einfluß verschiedener Konzentrationen von Natriumacetat auf die Trockensubstanzbildung.

(Mittelwerte in mg/250 ccm/25 Tage.)

Na-Aacetat in %	<i>Euglena viridis</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Euglena gracilis var. robusta</i>	<i>Astasia longa</i>	<i>Astasia quartana</i>	<i>Astasia Chattoni</i>
1,0	51,2	64,3	81,6	82,3	71,2	79,6
0,75	50,8	63,1	81,0	81,1	70,6	78,8
0,50	50,5	62,5	81,0	81,4	70,5	78,3
0,25	50,2	61,0	79,6	81,2	70,2	78,6
0,10	41,2	46,7	50,2	61,6	39,7	42,8
0,075	12,1	10,8	14,7	20,1	13,6	14,8
0,050	4,3	2,8	3,5	6,7	4,3	2,7
0,025	0,2	0,2	0,8	0,3	0,2	0,1
0,010	—	—	0,2	—	—	—
0,0075	—	—	—	—	—	—
0,0050	—	—	—	—	—	—
ohne Acetat	—	—	—	—	—	—

Stickstoffkonzentration und Ernteertrag: Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe finden sich in Tabelle XI. Der  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Stickstoff

Tabelle XI. Einfluß der Stickstoffkonzentration auf die Trocken-  
substanzbildung.  
(Mittelwerte in mg/250 ccm/25 Tage.)

$\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$ in %	<i>Euglena</i> <i>viridis</i>	<i>Euglena</i> <i>gracilis</i>	<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	<i>Astasia</i> <i>longa</i>	<i>Astasia</i> <i>quartana</i>	<i>Astasia</i> <i>Chattoni</i>
$10^{-1}$	48,5	60,8	81,2	79,6	71,0	80,4
$10^{-2}$	48,7	61,5	82,6	79,7	70,2	81,2
$10^{-3}$	16,8	21,2	30,6	28,9	22,1	35,8
$10^{-4}$	3,5	4,6	5,9	4,1	3,2	4,0
$10^{-5}$	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
$10^{-6}$	—	—	—	—	—	—
ohne $\text{NH}_4\text{NO}_3$	—	—	—	—	—	—

wurde in Konzentrationen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}\%$  geboten.  $10^{-5}\%$  N erlauben die erste noch äußerst geringe Vermehrung, maximale Erträge werden mit  $10^{-2}\%$  N erzielt.

#### 7. Der Einfluß verschiedener Aneurinkonzentrationen auf das Erntetrockengewicht.

Zur Verwendung gelangte die weiter oben in ihrer Zusammensetzung näher angegebene Nährösung D. Der Aneurinzusatz erfolgte in Konzentrationen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-10}\%$ . In Tabelle XII sind die Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmungen sowie die berechneten Vermehrungsfaktoren zusammengestellt. Die Versuche zeigten, daß das Aneurin-Optimum für die einzelnen untersuchten Arten verschieden ist und daß

Tabelle XII. Einfluß der Aneurinkonzentration auf die Trocken-  
substanzbildung.

(Mittelwerte. T = Trockengewicht in mg/250 ccm/23 Tage, F = Vermehrungsfaktor.)

Arten		Aneurinkonzentration in %										
		$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	ohne	
<i>Euglena</i> <i>viridis</i>	T	36,1	48,3	48,1	<b>50,5</b>	31,2	8,5	1,3	0,8	0,4	0,4	
	F	90,4	120,9	120,1	<b>126,1</b>	77,9	21,3	3,3	2,0	1,0	—	
<i>Euglena</i> <i>gracilis</i>	T	53,6	60,2	<b>61,3</b>	42,6	12,0	3,2	1,5	1,1	0,8	0,6	
	F	89,3	100,3	<b>102,3</b>	71,0	20,0	5,3	2,5	1,8	1,0	—	
<i>Euglena</i> <i>gracilis</i> var. <i>robusta</i>	T	56,8	72,5	78,3	80,1	<b>82,5</b>	51,3	20,8	4,5	1,2	0,8	
	F	71,0	90,8	97,1	100,1	<b>103,1</b>	64,1	26,0	5,6	1,5	—	
<i>Astasia</i> <i>longa</i>	T	71,5	79,6	<b>81,2</b>	58,6	24,2	7,8	2,1	1,0	0,8	0,8	
	F	89,5	99,4	<b>101,3</b>	73,2	30,2	9,7	2,6	1,2	1,0	—	
<i>Astasia</i> <i>quartana</i>	T	47,2	60,8	<b>69,7</b>	41,6	17,6	5,2	2,4	1,2	0,9	0,6	
	F	78,7	101,2	<b>116,0</b>	69,2	29,3	8,7	4,0	2,0	1,5	—	
<i>Astasia</i> <i>Chattoni</i>	T	70,7	77,3	<b>80,1</b>	59,7	20,2	6,3	2,4	1,2	0,8	0,7	
	F	101,0	110,4	<b>114,4</b>	85,3	28,9	9,0	3,4	1,8	1,1	—	

nicht nur suboptimale, sondern auch supraoptimale Konzentrationen das Erntetrockengewicht verhältnismäßig rasch absinken lassen. Die einzelnen Versuche zeigten für die untersuchten Eugleninen folgende Konzentrationen als optimal:

<i>Euglena viridis</i> .....	10 <sup>-5</sup> %	<i>Astasia longa</i> .....	10 <sup>-4</sup> %
<i>Euglena gracilis</i> .....	10 <sup>-4</sup> %	<i>Astasia quartana</i> .....	10 <sup>-4</sup> %
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	10 <sup>-6</sup> %	<i>Astasia Chattoni</i> .....	10 <sup>-4</sup> %

#### 8. Vergleich der Aneurinwirkung mit der eines Thiazol-Pyrimidin-Gemisches.

In gleicher Weise wie dies in einigen vorangegangenen Untersuchungen geschehen war, erfolgte auch hier die Feststellung der Wirkung der Bestandteile des Aneurinmoleküls auf die Vermehrung.

Die in Tabelle XIII zusammengestellten Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmungen zeigen, daß ein Thiazol-Pyrimidin-Gemisch in allen Fällen Aneurin zu ersetzen vermag, daß also alle untersuchten Eugleninen imstande sind, die Synthese von Thiazol und Pyrimidin zu Aneurin durchzuführen. Thiazol allein vermag für die untersuchten *Euglena*-Arten das Aneurin nahezu restlos zu ersetzen, *Euglena* ist demnach fähig, Pyrimidin selbst zu bereiten, während die *Astasien* mit einem alleinigen Zusatz von Thiazol nur rund 50 v. H. der normalen Ernten liefern, also teilweise das Vermögen zur Pyrimidin-Synthese eingebüßt haben müssen. Der Zusatz von Pyrimidin allein ermöglicht in allen Fällen nur eine sehr geringe Ernte. Wenn berücksichtigt wird,

Tabelle XIII. Einfluß von Aneurin und seinen Komponenten auf die Trockensubstanzbildung.

(Mittelwerte in mg/250 ccm/25 Tage.) T = Trockengewicht, F = Vermehrungsfaktor.)

Arten		Wachstumsfaktoren				
		Aneurin	Thiazol + Pyrimidin	Thiazol	Pyrimidin	ohne
<i>Euglena viridis</i> .....	T	50,1	48,9	45,8	2,8	0,5
	F	100,2	97,8	91,6	5,6	—
<i>Euglena gracilis</i> .....	T	59,4	60,3	58,6	2,4	0,5
	F	118,8	120,6	117,2	4,8	—
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>robusta</i>	T	82,5	81,8	78,5	3,2	0,7
	F	117,9	116,9	112,1	4,6	—
<i>Astasia longa</i> .....	T	81,0	76,5	41,6	1,2	0,7
	F	115,7	109,3	59,4	1,7	—
<i>Astasia quartana</i> .....	T	68,5	65,3	32,5	1,0	0,5
	F	137,0	130,6	65,0	2,0	—
<i>Astasia Chattoni</i> .....	T	76,9	72,8	40,5	1,4	0,7
	F	109,9	104,0	57,9	2,0	—

daß unser Pyrimidinpräparat infolge der Herstellungsweise sicher noch Spuren von Thiazol enthält, kann angenommen werden, daß sämtliche untersuchten Arten nicht imstande sind, mit Pyrimidin allein sich zu vermehren. Das Vermögen zur Thiazolbildung ist also restlos verlorengegangen.

### Besprechung der Versuchsergebnisse.

In den drei vorangegangenen Mitteilungen dieser Arbeitenreihe wurden Untersuchungen besprochen, welche die Bedeutung eines Wirkstoffes — Aneurin — für *Chilomonaden*, *Polyblepharidineen* und *Polytomeen* aufzeigten. In Fortsetzung dieser Arbeiten und zum vorläufigen Abschluß erfolgte hier die Untersuchung einer weiteren Gruppe *heterotropher Flagellaten*, der *Eugleninen*. Die vorliegenden vier Mitteilungen umfassen somit alle Gruppen *farbloser Flagellaten*, von denen Vertreter bisher in Reinkultur gewonnen werden konnten.

Vorversuche hatten ergeben, daß die Bedeutung des physiologischen Zustandes eines Zellgemisches, das zur Beimpfung einer Versuchsreihe verwendet werden soll, bei *Eugleninen* bei weitem nicht in dem Maße vorhanden ist, wie dies bei den anderen oben genannten Gruppen *farbloser Flagellaten* der Fall ist. Die nur in einem vermehrten Reservestoffgehalt erkennbare Degeneration der hier untersuchten *Flagellaten*-Arten ist so geringfügig, daß sie bei der Durchführung verschiedener Versuchsreihen kaum zum Ausdruck kommt. Das gleiche Verhalten wurde bereits früher (Ondratschek 1941 c) bei ernährungsphysiologischen Untersuchungen festgestellt. Die Impfmenge erwies sich hier im Gegensatz zu früheren Ergebnissen als ein für den endgültigen Ernteertrag nicht unwesentlicher Faktor. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, mußten sämtliche Versuche mit einer definierten Impfmenge versehen werden.

In ähnlicher Weise wie dies für *Polytomeen* bereits früher geschehen war, konnten auch hier anfängliche Mißerfolge durch den Mangel an Zink erklärt werden. Zink ist für alle untersuchten *Eugleninen* lebensnotwendig.

Nach Feststellung dieser Ergebnisse, welche für die Durchführung der eigentlichen Untersuchungen erst die Voraussetzung bilden, konnte die Analyse des Aneurineinflusses quantitativ vorgenommen werden. Ausgehend von chemisch undefinierten Stickstoffquellen, wie Pepton Vaillant, wurde über Aminosäuren zu sehr einfach gebauten anorganischen Verbindungen geschritten, wobei in allen Fällen die Bedeutung von Aneurin als Wachstumsfaktor eindeutig, und zwar für alle untersuchten Organismen aufgezeigt werden konnten.

Anschließende Versuchsreihen hatten die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Konzentration der Kohlenstoff- und

Stickstoffquelle und der zugehörigen Erntemenge zur Aufgabe. Der Ernteertrag wird einmal durch die Mengen des vorhandenen Acetats bestimmt, wobei das Optimum bei rund 0,1 % Na-Acetat liegt, zum anderen Male durch die Konzentration an Stickstoff, wobei 0,01 % N am günstigsten wirkt. Zwischen der gegebenen Stickstoff-Konzentration und der zugehörigen günstigsten Aneurinmenge herrschen auch hier dieselben Gesetzmäßigkeiten, wie sie Schopfer (1939) aufgezeigt hat und wie wir sie wiederholt bestätigen konnten. Das Aneurin-Optimum ist für die einzelnen untersuchten Arten verschieden. *Euglena viridis* liefert die größten Ernten mit  $10^{-5}\%$  Aneurin, *Euglena gracilis* var. *robusta* mit  $10^{-6}\%$ , für *E. gracilis*, *Astasia longa*, *A. quartana* und *A. Chattoni* sind  $10^{-4}\%$  Aneurin am günstigsten.

### Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung von Aneurin als Wachstumsfaktor für *farblose Flagellaten* auch für die Gruppe der *Eugleninen* als zutreffend auf. Es kann durch ein Thiazol-Pyrimidin-Gemisch vollständig, durch Thiazol mindest teilweise ersetzt werden. Das Aneurin-Optimum ist für einzelne Arten verschieden, es bewegt sich zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-6}\%$ .

Die Ernteerträge werden bei Vorhandensein einer optimalen Aneurinmenge durch den C- und N-Gehalt der assimilierbaren Nährstoffe quantitativ bestimmt.

### Literatur.

Ondratschek, K., diese Zeitschr. **11**, 239, 1940; **12**, 46, 1941; **12**, 91, 1941; Beih. z. Bot. Zentralbl. **61**, Abt. A, 277, 1941; Schopfer, W., Ergebn. d. Biol. **16**, 1, 1939.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität  
in Prag.)

## Über den Mineralsalzbedarf heterotropher Flagellaten.

Von  
**Karl Ondratschek.**

(Eingegangen am 2. Mai 1941.)

Die Erkenntnis, daß die Untersuchung des Mineralsalzbedarfes höherer Pflanzen nur schwer ursächliche Zusammenhänge zwischen dem Ablauf von Stoffwechselvorgängen und dem Mineralsalzbedarf liefern könnte, hat bereits frühzeitig dazu geführt, einzellige Organismen für ähnliche Untersuchungen heranzuziehen. Meist waren es *grüne Flagellaten*, bei denen die Beziehungen zwischen Kohlensäureassimilation und Mineralstoffwechsel näher betrachtet wurden. Eine kurze Bemerkung der wichtigsten Arbeiten findet sich bei *Pirson* (1937). Dem Mineralsalzbedarf heterotropher Mikroorganismen wurde hingegen geringe Beachtung geschenkt, meist erfolgte nur die Untersuchung der Notwendigkeit von Spurenelementen.

Im Laufe der Untersuchung des Wirkstoffbedarfes einer größeren Reihe *heterotropher Flagellaten* (Ondratschek 1940/41) erfolgten die ersten vorläufigen Feststellungen über die Ansprüche dieser Organismen an anorganische Nährstoffe, wobei gleichzeitig auch die jeweils auf die Trockensubstanzbildung am günstigsten wirkende Konzentration bestimmt wurde. Als weitere der oben angegebenen Untersuchungen auch die Notwendigkeit zur Beachtung der Bedürfnisse an Spurenelementen aufzeigten, machte es die hier eingeschlagene Arbeitsrichtung zwangsläufig zur Pflicht, die Ansprüche *heterotropher Flagellaten* bezüglich der anorganischen Nähr-, gegebenenfalls Wirkstoffe in einer eigenen Arbeit zu untersuchen. Die Fortschritte der analytischen Chemie, besonders der Mikrochemie, haben uns die nötigen Unterlagen geliefert, um diese Arbeit in möglichst genauer Weise durchführen zu können.

Im folgenden soll als erstes die Untersuchung des Bedarfes an anorganischen Nährstoffen erfolgen, wobei vorerst den Spurenelementen nur insofern Beachtung geschenkt wird, als dies in den früheren Arbeiten (Ondratschek 1941) als notwendig aufgezeigt wurde. Erst nach Abschluß dieser Versuchsreihen soll die Untersuchung des Bedarfes an Spurenelementen vorgenommen werden. Bereits einleitend sei festgestellt, daß ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Nährlementen und Spurenelementen damit nicht gemacht werden soll. Wir wollen lediglich

in der bisherigen Weise unter „Nährelementen“ jene verstehen, die in größerer Konzentration vorhanden sein müssen, um eine gute Vermehrung zu gewährleisten, während die Bezeichnung „Spurenelemente“ für solche zur Anwendung gelangt, die in erheblich geringerer Konzentration notwendig sind. Sie sind in nicht besonders gereinigten Präparaten meist von vornherein enthalten. Der Gebrauch dieser beiden Begriffe soll nichts über eine etwaig verschiedene physiologische Bedeutung aussagen. Es ist bis jetzt ungeklärt, ob jene Nährelemente, die nur in sehr geringen Mengen notwendig sind, als Pseudowachstumsfaktoren (Schopfer 1939) wirken. Vorerst scheint es zweckmäßiger, die wirksame Konzentration eines notwendigen Elements in dieser Beziehung außer acht zu lassen und zwischen „Nährelement“ und „Spurenelement“ (im bisherigen Sprachgebrauch) keine grundsätzlichen Unterschiede zu machen.

### Methodik und Versuchsobjekte.

Bezüglich der Durchführung der ernährungsphysiologischen Versuche sei auf eine frühere Mitteilung (Ondratschek 1940) verwiesen, in welcher Einzelheiten über die genaue Art der Versuchsanstellung sowie der Trockengewichtsbestimmung angegeben wurden. Eine Schilderung der Methodik zur Untersuchung der Bedeutung von Spurelementen für die Ernährung *heterotropher Flagellaten* wird aus Gründen der Zweckmäßigkeit unmittelbar bei den diesbezüglichen Versuchsserien gegeben. Zur Untersuchung gelangten folgende, bezüglich ihrer Variabilität und ihres Wirkstoffbedürfnisses genau bekannte *Flagellaten*-Stämme:

#### A. Cryptomonades.

<i>Chilomonas paramaecium</i> Ehrenberg	<i>Chilomonas longata</i> Ondratschek
<i>Chilomonas oblonga</i> Pascher	<i>Chilomonas globosa</i> Ondratschek
<i>Chilomonas coniformis</i> Ondratschek	

#### B. Volvocales.

##### a) *Polyblepharidinaeae.*

<i>Polytomella agilis</i> Aragao	<i>Polytomella globosa</i> Pascher
<i>Polytomella caeca</i> Pringsheim	

##### b) *Chlamydomonadinaeae.*

<i>Polytoma uvella</i> sensu strictu	<i>Polytoma papillatum</i> Pascher
Ehrenberg	<i>Polytoma cylindraceum</i> Pascher
<i>Polytoma minus</i> Pascher	<i>Polytoma ocellatum</i> Francé
<i>Polytoma obtusum</i> Pascher var.	<i>Polytoma tatraeare</i> Pascher var.
<sup>stigmata</sup> Ondratschek	<sup>astigmata</sup> Ondratschek
<i>Polytoma majus</i> Pascher var.	<i>Polytoma dorsiventrale</i> Pascher var.
<sup>astigmata</sup> Ondratschek	<sup>astigmata</sup> Ondratschek
<i>Polytoma angustum</i> Pascher	<i>Polytoma Pascheri</i> Moewus
<i>Polytoma caudatum</i> Korschikoff var.	<i>Polytoma curvatum</i> Ondratschek
<sup>astigmata</sup> Provasoli	<i>Polytoma coniforme</i> Ondratschek

## C. Eugleninae.

## a) Euglenaceae.

*Euglena gracilis* Klebs  
*Euglena viridis* Ehrenberg

*Euglena gracilis* Klebs var. *robusta*  
 Ondratschek

## b) Astasiaceae.

*Astasia longa* Pringsheim  
*Astasia Chattoni* Lwoff

*Astasia quartana* Moroff nov. comb.  
 Pringsheim

## Eigene Versuche.

## A. Nährelemente.

Dem Bedürfnis *heterotropher Flagellaten* an anorganischen Nährstoffen war man bisher bei Züchtungsversuchen stets so nachgekommen, daß in ziemlich willkürlicher Weise die von Kulturversuchen bei höheren Pflanzen her als notwendig bzw. günstig bekannten Verbindungen zur Nährlösung zugesetzt wurden. Untersucht wurde ja vorwiegend nur der Anspruch auf die C-, bestenfalls noch auf die N-Quelle, einem solchen nach Mineralsalzen wurde zwar nachgekommen, ohne jedoch besondere Versuche über diese Verhältnisse anzustellen. In der vorliegenden Arbeit sollen sämtliche anorganischen Nährelemente auf ihre Lebensnotwendigkeit hin untersucht werden und ferner soll festgestellt werden, welche Mengen die Vermehrung und Trockensubstanzbildung am günstigsten beeinflußten.

Die bisher übliche Angabe der Zusammensetzung einer Nährlösung erscheint für genaue Untersuchungen unzureichend, und zwar aus dem Grunde, weil einerseits der tatsächliche Gehalt einer Lösung an einem bestimmten Nährelement aus der Formel, die meist nicht einmal den Wassergehalt der Substanz angibt, nicht entnommen werden kann, und weil andererseits verschiedene Verbindungen desselben Elements als gleichwertig betrachtet werden könnten, obwohl der tatsächliche Anteil des bestimmten Elements in den einzelnen Verbindungen oft sehr bedeutend verschieden ist. Ein Beispiel möge das erläutern. 100 ccm einer 0,1 %igen  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Lösung enthalten 35 mg N, 100 ccm einer 0,1 %igen  $\text{KNO}_3$ -Lösung aber nur rund 13,8 mg, also fast ein Drittel. Trotzdem werden üblicherweise die beiden Lösungen als gleichwertig betrachtet. Um diese Übelstände zu vermeiden, wurden im folgenden die einzelnen näher zu untersuchenden Nährelemente in einer Form geboten, welche nur das eine Nährelement enthielt, also z. B. P als  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und nicht als  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , um so in diesem Falle das K auszuschalten. Die Stammlösungen wurden außerdem so bereitet, daß im Liter jeweils 100 mg des betreffenden Elements enthalten waren.

Wir begannen unsere Versuche mit einer Nährlösung in der bisher üblichen Form, von der wir die Gewißheit hatten, daß sie allen hier zu untersuchenden Flagellaten günstigste Lebensbedingungen bot und veränderten schrittweise ein Element um das andere in seiner Konzentration.

Die Versuche wurden in zweifacher Weise durchgeführt, einmal in Röhrchen mit 10 ccm Nährlösung, das andere Mal in 250 ccm Lösung in Kolben. Bei der ersten Art wurde laufend die Zahl der Zellen in der Volumeneinheit bestimmt, im zweiten Falle das Trockengewicht.

### 1. Einfluß der Stickstoff-Konzentration auf die Vermehrung und Trockensubstanzbildung.

Die in früheren Arbeiten viel verwendete Nährlösung D wurde mit einem Zusatz von Aneurin und Zink versehen und in ihrem Stickstoffgehalt weitgehend variiert. Der Aneurin- und Zinkzusatz sollte dem Wirkstoffbedürfnis Genüge leisten (s. Ondratschek 1941). Die Nährlösung hatte dann folgende Zusammensetzung: 0,2 % Na-Acetat, 0,01 %  $MgSO_4$ , 0,01 %  $K_2HPO_4$ , 0,001 %  $CaCl_2$ , 0,0001 %  $FeCl_3$ ,  $10^{-6}$  % Zink und je nach dem betreffenden Aneurinoptimum  $10^{-4}$  bis  $10^{-8}$  % Aneurin. Stickstoff wurde in Form von  $NH_4NO_3$  geboten, und zwar in einer Konzentration von 1,0 bis 0,0001 % N in insgesamt 17 Konzentrationsstufen.

Die Versuchsreihe zeigte sehr bald ein ziemlich gleichartiges Verhalten aller Flagellaten. Die Bestimmungen der Zellzahl wie auch die nur fallweise vorgenommenen Trockengewichtsbestimmungen zeigten bei einem Stickstoffgehalt von 0,01 % durchwegs die größten Ernterträge. Benachbarte Konzentrationen liefern ein ziemlich ähnliches Ergebnis. Zur Veranschaulichung werden in Tabelle I einige erläuternde Zahlen wiedergegeben. Auf eine zahlenmäßige Darstellung sämtlicher Ergebnisse kann verzichtet werden, da sich alle Organismen gleichmäßig verhielten. Es wird vielmehr von jeder systematischen Gruppe nur ein Vertreter angeführt, mit Ausnahme von *Polytoma*, wo jeweils ein Vertreter der drei, nach dem  $pH$ -Optimum unterschiedenen physiologischen Gruppen behandelt wird. Von den zahlreichen durchgeprüften Konzentrationen werden nur fünf ziemlich auseinanderliegende wiedergegeben. Sie genügen zur Erklärung vollständig.

Tabelle I. Einfluß verschiedener Stickstoff-Konzentrationen auf die Vermehrung.

(Zahl der Zellen im cmm nach 12 bzw. 20 Tagen<sup>1</sup>.)

Arten	Anfangs- $pH$	Aneurin in %	Stickstoff-Konzentrationen in % N				
			1,0	0,1	0,01	0,001	0,0001
<i>Chilomonas paramaecium</i>	6,6	$10^{-6}$	150	1070	<b>2010</b>	<b>780</b>	35
<i>Polytomella agilis</i> .....	6,5	$10^{-6}$	75	1320	<b>2480</b>	1220	210
<i>Polytoma uvella</i> .....	7,5	$10^{-8}$	140	1080	<b>2520</b>	800	135
<i>P. obtusum</i> .....	6,9	$10^{-8}$	80	850	<b>1970</b>	910	40
<i>P. ocellatum</i> .....	6,5	$10^{-6}$	185	1860	<b>2730</b>	1020	310
<i>Euglena gracilis</i> .....	6,5	$10^{-4}$	—	350	<b>1035</b>	470	60
<i>Astasia quartana</i> .....	6,7	$10^{-4}$	20	570	<b>1000</b>	620	130

<sup>1</sup> Eugleninen: Versuchsdauer 20 Tage, alle übrigen Arten 12 Tage.

Die Versuchsreihe wurde in einigen Konzentrationen auch mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bzw. soweit auswertbar mit  $\text{KNO}_3$  als Stickstoffquelle durchgeführt. Auch hierbei erwies sich eine Konzentration von 0,01 % N als die günstigste.

### 2. Einfluß der Kalium-Konzentration auf die Vermehrung und Trockensubstanzbildung.

In ähnlicher Weise wie im vorausgegangenen Abschnitt geschildert, sollte auch hier die am günstigsten wirkende Kaliummenge festgestellt werden. Da sich das Kalium in der Nährlösung D in Form von  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  findet, mußte dieses zuerst durch  $\text{KCl} + \text{Na}_2\text{HPO}_4$  ersetzt werden, worauf dann der Gehalt an K variiert werden konnte. Mit Ausnahme des N, welcher in der als optimal gefundenen Konzentration von 0,01 % zugesetzt wurde, blieben die übrigen Nährsalze in ihrem Mengenverhältnis unverändert. Der K-Gehalt der Lösung wurde zwischen 1,0 und 0,00001 % K variiert.

Die Trockengewichtsbestimmungen wie auch die Zellzahlbestimmungen zeigten eine Konzentration von 0,005 % K als die günstigste auf. Mit zunehmender Konzentration nehmen die Erträge in noch stärkerem Maße ab, als dies beim Stickstoff der Fall war. Mit abnehmender Konzentration ist der Abfall der Ertragskurve allmählicher. Tabelle II zeigt wiederum einige der Ergebnisse auf.

Tabelle II. Einfluß verschiedener Kalium-Konzentrationen auf die Vermehrung.

(Zahl der Zellen im cmm nach 12 bzw. 20 Tagen.)

Arten	Anfangs- $p\text{H}$	Aneurin in %	Kalium-Konzentrationen in % K				
			0,5	0,05	0,005	0,0005	0,00005
<i>Chilomonas paramaecium</i>	6,6	$10^{-6}$	20	920	<b>2000</b>	1110	250
<i>Polytomella agilis</i> .....	6,5	$10^{-6}$	35	1290	<b>2520</b>	1600	270
<i>Polytoma uvella</i> .....	7,6	$10^{-8}$	40	810	<b>2490</b>	1280	145
<i>P. obtusum</i> .....	7,0	$10^{-8}$	—	770	<b>2020</b>	1190	70
<i>P. ocellatum</i> .....	6,6	$10^{-6}$	75	1680	<b>2690</b>	1610	250
<i>Euglena gracilis</i> .....	6,6	$10^{-4}$	20	235	<b>1015</b>	740	70
<i>Astasia quartana</i> .....	6,7	$10^{-4}$	—	430	<b>970</b>	470	70

### 3. Einfluß der Phosphat-Konzentration auf die Vermehrung und Trockensubstanzbildung.

Die Nährlösung D wurde so verändert, daß der Stickstoff in Form von 0,01 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$  und Kalium als 0,005 %  $\text{KCl-K}$  zugesetzt wurden,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurde in seiner P-Konzentration in der bisherigen Weise variiert, während die übrigen Nährsalze unverändert blieben.

Auch hier wiederum war ein dem früheren Ergebnis entsprechendes Verhalten aller Organismen festzustellen. Die günstigste Phosphatkonzentration liegt bei 0,002 % P, wie die in Tabelle III auszugsweise zusammengestellten Ergebnisse zeigen.

Tabelle III. Einfluß verschiedener Phosphat-Konzentrationen auf die Vermehrung.

(Zahl der Zellen im cmm nach 12 bzw. 20 Tagen.)

Arten	Anfangs- $p_{\text{H}}$	Aneurin in %	Phosphat-Konzentrationen in % P				
			0,2	0,02	0,002	0,0002	0,00002
<i>Chilomonas paramaecium</i>	6,5	$10^{-6}$	—	780	<b>1950</b>	970	50
<i>Polytomella agilis</i> .....	6,5	$10^{-6}$	—	890	<b>2460</b>	1040	10
<i>Polytoma uvella</i> .....	7,5	$10^{-8}$	—	750	<b>2500</b>	760	40
<i>P. obtusum</i> .....	6,9	$10^{-8}$	—	630	<b>2010</b>	910	25
<i>P. ocellatum</i> .....	6,5	$10^{-6}$	—	1120	<b>2580</b>	1070	120
<i>Euglena gracilis</i> .....	6,5	$10^{-4}$	—	135	<b>980</b>	320	—
<i>Astasia quartana</i> .....	6,6	$10^{-4}$	—	340	<b>1030</b>	260	—

Wie aus der vorstehenden Tabelle zu entnehmen ist, ist der Wirkungsbereich verschiedener Phosphatkonzentrationen enger, als dies bei Kalium oder Stickstoff der Fall war. Während in den beiden letztgenannten Fällen sowohl die hundertfache wie die auf ein Hundertstel verdünnte Optimalkonzentration in den meisten Fällen noch bescheidene Vermehrung zuläßt, ist dies beim Phosphat mit wenigen Ausnahmen nicht mehr der Fall.

#### 4. Einfluß der Magnesium-Konzentration auf die Vermehrung und Trockensubstanzbildung.

Die nach den bisherigen Ergebnissen entsprechend abgeänderte Nährlösung D sollte nun in ihrem Magnesiumgehalt variiert werden. Um dies zu ermöglichen, ohne dabei gleichzeitig den Sulfatgehalt zu verändern, wurde zuerst das  $\text{MgSO}_4$  durch  $\text{MgCl}_2 + \text{Na}_2\text{SO}_4$  ersetzt und dann der Mg-Gehalt durch Zusatz verschiedener Mengen an  $\text{MgCl}_2$  verändert.

Die Trockengewichtsbestimmungen ergaben maximale Ernten bei Anwesenheit von 0,0001 % Mg, die Zellzahlbestimmungen lieferten auch bei naheliegenden Werten das annähernd gleiche Ergebnis. Einige Einzelheiten finden sich in Tabelle IV.

Tabelle IV. Einfluß verschiedener Magnesium-Konzentrationen auf die Vermehrung.

(Zahl der Zellen im cmm nach 12 bzw. 20 Tagen.)

Arten	Anfangs- $p_{\text{H}}$	Aneurin in %	Magnesium-Konzentrationen in % Mg				
			$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
<i>Chilomonas paramaecium</i>	6,6	$10^{-6}$	80	1270	<b>2050</b>	700	35
<i>Polytomella agilis</i> .....	6,5	$10^{-6}$	220	1860	<b>2520</b>	840	20
<i>Polytoma uvella</i> .....	7,5	$10^{-8}$	230	1650	<b>2490</b>	670	35
<i>P. obtusum</i> .....	7,0	$10^{-8}$	230	1600	<b>1980</b>	520	—
<i>P. ocellatum</i> .....	6,5	$10^{-6}$	490	1880	<b>2620</b>	630	—
<i>Euglena gracilis</i> .....	6,5	$10^{-4}$	—	780	<b>1070</b>	200	—
<i>Astasia quartana</i> .....	6,5	$10^{-4}$	—	890	<b>1080</b>	260	—

5. Einfluß der Sulfat-Konzentration auf die Vermehrung und Trockensubstanzbildung.

In gleicher Weise wie bisher wurde durch Hinzufügen von verschiedenen Mengen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  der  $\text{SO}_4$ -Gehalt der Nährlösung variiert. Trockengewichtsbestimmungen und Bestimmungen der Zellzahl (Tabelle V) ergaben die größten Ernteerträge bei einem Sulfatgehalt von 0,001 % S.

Tabelle V. Einfluß verschiedener Sulfat-Konzentrationen auf die Vermehrung.

(Zahl der Zellen im cmm nach 12 bzw. 20 Tagen.)

Arten	Anfangs- $\text{pH}$	Aneurin in %	Sulfat-Konzentrationen in % S				
			$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
<i>Chilomonas paramaecium</i>	6,5	$10^{-6}$	110	890	<b>1950</b>	1020	120
<i>Polytomella agilis</i> .....	6,5	$10^{-6}$	120	1000	<b>2450</b>	750	90
<i>Polytoma uvella</i> .....	7,5	$10^{-8}$	180	1350	<b>2380</b>	530	110
<i>P. obtusum</i> .....	7,0	$10^{-8}$	200	1070	<b>2030</b>	560	130
<i>P. ocellatum</i> .....	6,5	$10^{-6}$	150	1260	<b>2690</b>	740	200
<i>Euglena gracilis</i> .....	6,5	$10^{-4}$	80	470	<b>1020</b>	370	40
<i>Astasia quartana</i> .....	6,5	$10^{-4}$	50	690	<b>970</b>	230	20

6. Einfluß der Calcium- und der Eisen-Konzentration auf die Vermehrung und Trockensubstanzbildung.

Die Versuchsanstellung geschah in der gleichen Art wie bei den vorher geschilderten Versuchsreihen. Die Ergebnisse waren eindeutig. 0,0005 % Ca und 0,00005 % Fe erwiesen sich in allen Fällen als am günstigsten wirkend, in Abwesenheit von Ca tritt keine Vermehrung ein, Ca ist also unentbehrlich. Von einer Wiedergabe der aufgefundenen Zahlen wird abgesehen, da sich diese in ähnlichen Größen verhalten, wie dies in den vorstehenden Tabellen an Hand anderer Nährelemente gezeigt wurde.

Zusammenfassend wird nachstehend eine Nährlösung angegeben, welche auf Grund der eben aufgezeigten Befunde zusammengestellt worden war und sich in allen Fällen als sehr günstig erwies: 0,01 % N als  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,005 % K als  $\text{KCl}$ , 0,002 % P als  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,001 % S als  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,0001 % Mg als  $\text{MgCl}_2$ , 0,0005 % Ca als  $\text{CaCl}_2$  und 0,00005 % Fe als  $\text{FeCl}_3$ . Hierzu kommen noch die Kohlenstoffquelle, Aneurin bzw. Spurenelemente, über deren Konzentration an dieser Stelle nichts ausgesagt werden soll.

7. Ergänzende Versuchsreihen.

Auf Grund der Ergebnisse der eben geschilderten Versuchsreihen konnte abschließend eine für sämtliche untersuchten Flagellaten günstige Nährlösung zusammengestellt werden. Unsere nächste Aufgabe war

der Vergleich der Wirkung dieser Lösung mit der in früheren Arbeiten verwendeten. Trockensubstanzbestimmungen zeigten in allen geprüften Fällen die Gleichwertigkeit beider Lösungen. Es wurde aber trotzdem noch eine weitere Versuchsreihe angelegt, in der die wichtigsten Bestandteile der neu angegebenen Mineralsalzlösung in ähnlicher Weise wie früher variiert wurden. Damit sollte der Einwurf begegnet werden, daß sich bei Änderung eines Elementes die Wirkung der übrigen nicht abgeänderten Zusätze durchaus nicht gleichbleibend verhalten müsse. Auch diese Versuche zeigten die neu angegebenen Mineralzusätze als für alle untersuchten Arten optimal.

### B. Spurenelemente.

Nachdem im ersten Abschnitt die Untersuchung der üblicherweise als „Nährlemente“ bezeichneten Stoffe erfolgt worden war, sollte nun das Bedürfnis unserer Flagellaten an Elementen untersucht werden, die nur in geringen Mengen lebensnotwendig sind, also der „Spurenelemente“.

#### 1. Das Entfernen von Spurenelementen durch Kohlebehandlung.

*Roberg* hat 1931 in eingehender Weise die vorstehende, zuerst von *Bortels* (1927) in Angriff genommene, Frage experimentell erörtert. Infolge der Zweckmäßigkeit dieser Arbeitsweise entschlossen wir uns, auf die gleiche Weise vorzugehen. Da uns naturgemäß nicht die gleichen Kohlesorten zur Verfügung standen, wie *Roberg* sie verwendet hatte, mußte als erstes die Untersuchung der Zusammensetzung, des Wassergehaltes und ähnlicher Verhältnisse erfolgen. Zur Verfügung standen uns Lindenholz-, Buchenholz- und Filtrierkohle. Durch Veraschung wurde der Anteil der Kohle an unverbrennbaren Stoffen festgestellt. Lindenholzkohle wies 1,073 %, Buchenholzkohle 1,08 % und Filtrierkohle 1,36 % Asche auf. Der Feuchtigkeitsgehalt schwankte bei L. um 18 %, bei B. um 15 % und bei F. um 25 %. Es wurde nun versucht, durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure Teile der unverbrennbaren Stoffe zu entfernen. Der Aschengehalt betrug nach Salzsäurebehandlung bei L. 0,206, bei B. 0,233 und bei F. 0,367 %, es wurden also bei L. 80,4 %, bei B. 78,8 % und bei F. 72,8 % des ursprünglichen Aschengehaltes herausgelöst. Um den Aschengehalt noch weiter zu verringern, wurden mit verschiedenen anderen Säuren Versuche angestellt. Die besten Ergebnisse erhielten wir nach einer Behandlung mit 2 n HCl und anschließend mit 2 n HNO<sub>3</sub>. Der Gehalt an unlösbarer Substanz betrug nach Veraschung nunmehr bei L. 0,08 %, bei B. 0,113 % und bei F. 0,224 %. Den geringsten Aschengehalt wies demnach Lindenholzkohle auf, die durch Behandlung mit HCl und HNO<sub>3</sub> rund 92,5 % des Aschengehaltes verliert.

Von besonderer Wichtigkeit war weiter die Untersuchung der Substanzabgabe von Kohle an Wasser. Wir verwendeten durchwegs ein dreifach destilliertes Wasser, bei welchem die letzte Destillation in einer Quarzapparatur vorgenommen wurde. Der Destillationsapparat war mit einem Tropfenfänger nach *Fitting* (siehe *Roberg* 1931) versehen. 200 ccm eines derart bereiteten dreifach destillierten Wassers hinterlassen beim Verdampfen in einer Platinschale keinen wägbaren Rückstand. Zur Prüfung der Abgabe von Stoffen durch Kohle an Wasser wurden die Kohleproben vorerst zur Gänze von Wasser befreit (um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten), sodann wurden 200 ccm einer 5%igen Kohleaufschwemmung bereitet, diese geschüttelt und durch ein gesintertes G'salz filtriert. Nach dem Eindampfen erhielten wir folgende Rückstände: Unbehandelte Lindenholzkohle gibt 8,4 mg, mit HCl gewaschene 6,2 und mit HCl und HNO<sub>3</sub> behandelte 0,7 mg Rückstand. Bei Buchenholzkohle ergaben die gleichen Bestimmungen 8,8 bzw. 8,5 bzw. 2,2 mg, und Filtrierkohle hinterließ einen Rückstand von 14,3 bzw. 2,5 bzw. 1,1 mg. Mit HCl und HNO<sub>3</sub> gewaschene Lindenholzkohle erwies sich also sowohl bezüglich des Aschengehaltes wie auch in bezug auf die Abgabe von Stoffen an Wasser als am geeignetsten.

Es schien ferner notwendig, eine qualitative Analyse der von Kohle an Wasser abgegebenen Stoffe vorzunehmen. Mehrere Liter Wasser wurden mit 5% gereinigter Lindenholzkohle geschüttelt, die Kohle abfiltriert, das Wasser bis auf wenige ccm eingedampft und mit diesen nach den Methoden der Tüpfelanalyse (*Feigl* 1935) die nachstehenden Bestimmungen vorgenommen.

*Ammonstickstoff*: Mittels Paranitrodiazobenzol in salzsaurer Lösung. Ergebnis zweifelhaft, höchstens Spuren vorhanden. Mit MnSO<sub>4</sub> und AgNO<sub>3</sub> nicht nachweisbar. *Nitratstickstoff*: Schwache Reaktion mit Diphenylamin, ebenso mit Brucin. *Kalium*: Mit Natriumkobaltinitrat nachweisbar. *Calcium*: Mit Dioxyweinsäureosazonnatrium starke Reaktion. *Phosphat*: Mit Ammonmolybdat und Benzidin bei Anwesenheit von Weinsäure nicht nachweisbar. *Sulfat*: Mit Bariumhodizonat nachweisbar. *Magnesium*: Mit Alkalihypojojodit in Spuren nachweisbar. *Natrium*: Mit Zinkuranylacetat nachweisbar.

Bisher wurde also eindeutig eine Abgabe von K, Ca, SO<sub>4</sub>, Na und  $\pm$  Mg nachgewiesen, also durchwegs von Elementen, welche bei der Prüfung der Wirkung von Spurenelementen nicht stören können. Weit größere Bedeutung kommt hingegen der folgenden Analyse zu, welche die Abgabe von Spurenelementen durch Kohle an Wasser vornehmen sollte.

*Eisen*: Mit KCNS, wie auch mit Dimethylglyoxin nicht nachweisbar. *Mangan*: Mit Benzidin nicht nachweisbar. *Zink*: Weder mit Dithizon noch durch Bildung von Rinmansgrün nachweisbar. *Arsen*: Mit Zinnchlorür nicht nachweisbar. *Kupfer*: Mit Dithizon nicht nachweisbar.

Die vorstehenden Untersuchungen haben also ergeben, daß durch Schütteln von Wasser mit Kohle keinerlei Stoffe in das Wasser übergehen, die bei der Prüfung des Einflusses von Spurenelementen auf die Vermehrung stören könnten.

Bevor an die Durchführung der eigentlichen Versuche geschritten werden konnte, mußte noch untersucht werden, welcher Verlust beim Schütteln einer Nährlösung mit Kohle an einzelnen Nährlementen eintreten kann. Je 1000 ccm 0,1 %iger Lösungen der einzelnen anorganischen Nährsalze wurden mit 5 % Kohle geschüttelt und nach Filtration der Verlust bestimmt. Im einzelnen hatten die Analysen nachstehendes Ergebnis:

*Stickstoff* (als  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ): Bestimmungsverfahren: Mikrokjeldahl. Verlust durch Kohlebehandlung unter 1 %.

*Kalium* (als  $\text{KCl}$ ): Bestimmungsverfahren: Fällung als Kobaltinitrit und Bestimmung als Perchlorat. Verlust durch Kohlebehandlung rund 10 %.

*Magnesium* (als  $\text{MgCl}_2$ ): Bestimmungsverfahren: Fällung als Magnesiumammonphosphat und Wägung als Magnesiumpyrophosphat. Verlust durch Kohlebehandlung 5–6 %.

*Phosphor* (als  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): Bestimmungsverfahren: Fällung als Magnesiumpyrophosphat. Verlust durch Kohlebehandlung rund 5 %.

*Schwefel* (als  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ): Bestimmungsverfahren: Fällung als Bariumsulfat. Verlust durch Kohlebehandlung unter 1 %.

*Calcium* (als  $\text{CaCl}_2$ ): Bestimmungsverfahren: Fällung als Calciumoxalat. Verlust durch Kohlebehandlung 1–2 %.

*Eisen* wird in der üblichen Konzentration von 0,00005 % restlos zurückgehalten.

Um die Verluste der Kohlebehandlung auszuschalten und so vergleichbare Versuchsergebnisse zu erhalten, wurde folgender Weg eingeschlagen. Es wurden Stammlösungen in etwas mehr als 100facher Konzentration angesetzt, diese mit Kohle geschüttelt, um gegebenenfalls anwesende Spurenelemente zu entfernen, in einem Teil der Lösung der Gehalt des betreffenden Nährelements bestimmt und durch Zusatz einer berechneten Menge von dreifach destilliertem Wasser bis zur genau 100fachen Konzentration verdünnt.

## 2. Vorrersuche zur Feststellung der Lebensnotwendigkeit einiger Spurenelemente.

Die nach den Ergebnissen des ersten Hauptteiles zusammengesetzte Nährlösung wurde in Röhrchen aus Quarzglas abgefüllt und mit den nachstehenden Elementen in Konzentrationen von  $10^{-5}$  bis  $10^{-10}$  % versetzt: Zn (als  $\text{ZnSO}_4$ ), Mn (als  $\text{MnSO}_4$ ), Cu (als  $\text{CuSO}_4$ ), Mo (als Ammonmolybdat), Al [als  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ], As (als  $\text{AsCl}_3$ ) und Be (als  $\text{BeSO}_4$ ). Nach der Sterilisation erfolgte Beimpfung mit je einem Tropfen einer Aufschwemmung von Zellen im Normalzustand.

Wider Erwarten verliefen sämtliche Versuche trotz wiederholter Beimpfung und mannigfaltiger Abänderung der Konzentration ergebnislos. Dies war um so erstaunlicher, als wir in zwei früheren Arbeiten (Ondratschek 1941) zeigen konnten, daß mindest für *Polytomeen* und *Eugleninen* Zink dem Spurenelementbedürfnis vollauf Genüge leistet. Allerdings erfolgte damals weder eine Entfernung von als Verunreinigung möglicherweise anwesenden Spurenelementen noch eine Verwendung von Quarzglas. Die Vermutung, daß neben Zink noch ein oder mehrere andere Spurenelemente notwendig sind, war sehr naheliegend.

Wir führten die nun folgenden Versuche mit Zusätzen der verschiedensten Kombinationen der oben genannten Elemente durch, wobei wir uns auf wenige Flagellaten beschränkten, um die Zahl der Versuche in erträglichen Grenzen zu halten. Nach umfangreichen Versuchen, die sich über fünf Monate erstreckten, konnte endlich eine zufriedenstellende Vermehrung mit einem Zusatz von Zn, Mn und As erzielt werden. Anschließende Versuche zeigten dann auch die Wirksamkeit dieser drei Elemente für alle übrigen hier untersuchten Organismen. Die übrigen geprüften Spurenelemente sind zum Teil unwirksam (Mo, Be), zum Teil giftig (Cu). Wir hatten bei den eben genannten Versuchen in ziemlich willkürlicher Weise  $10^{-6}\%$  Zn,  $10^{-6}\%$  Mn und  $10^{-10}\%$  As zugesetzt. Es war unsere nächste Aufgabe, die wirksamsten Konzentrationen festzustellen. Die Versuche wurden so durchgeführt, daß jeweils zwei Spurenelemente konstant gehalten und das dritte in seiner Konzentration verändert wurde. Sämtliche Versuche wurden in Röhrchen mit 10 ccm Lösung durchgeführt, sie hatten das in Tabelle VI zusammengestellte Ergebnis.

Wir sehen aus der nachstehenden Tabelle, daß sämtliche Arten  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}\%$  Zink, ferner  $10^{-6}$  bis  $10^{-10}\%$  Mangan und 6 von 28 Arten außerdem  $10^{-10}$  bis  $10^{-11}\%$  Arsen benötigen. Damit soll nun nicht gesagt sein, daß das absolute Bedürfnis an Spurenelementen aufgezeigt ist, obige Zahlen sind nur die Ergebnisse unserer so genau wie möglich durchgeföhrten Versuche. Es kann durchaus der Fall sein, daß bei der Kohlebehandlung ein oder mehrere in äußerst geringen Spuren wirkende Elemente nicht erfaßt wurden.

Zum Abschluß wurden einige quantitative Versuche in Quarzglas angestellt, die zur Hälfte mit einer nicht vorbehandelten, zur Hälfte mit einer durch Kohlebehandlung vorerst befreiten und nachträglich durch Zusatz der jeweils optimalen Sprungelemente wieder ergänzten Nährösung durchgeführt wurden. Der Ansatz geschah zu je 100 ccm in Quarzkolben. Die Trockengewichtsbestimmungen der Ernteerträge ergaben durchwegs sehr nahestehende Werte, es ist damit also nach-

Tabelle VI. Zusammenstellung der für die Vermehrung notwendigen Spurenelemente.

Arten	Zink in %	Mangan in %	Arsen
<i>Cryptomonaden.</i>			
<i>Chilomonas paramecium</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-6}$	nicht notwendig
<i>Ch. oblonga</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-6}$	„ „
<i>Ch. coniformis</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-6}$	„ „
<i>Ch. longata</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-6}$	„ „
<i>Ch. globosa</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-6}$	„ „
<i>Volvocalen.</i>			
<i>Polytoma agilis</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	nicht notwendig
<i>P. caeca</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	„ „
<i>P. globosa</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	„ „
<i>Polytoma uvelia</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-10}$	
<i>P. minus</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	„ „
<i>P. obtusum</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-10}$	„ „
<i>P. majus</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	„ „
<i>P. angustum</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-10}$	„ „
<i>P. caudatum</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-8}$	„ „
<i>P. papillatum</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-10}$	„ „
<i>P. cylindraceum</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	„ „
<i>P. ocellatum</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-9}$	„ „
<i>P. tetraoleare</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-10}$	
<i>P. dorsiventrale</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$
<i>P. Pascheri</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-10}$	nicht notwendig
<i>P. curvatum</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-8}$	$10^{-11}$
<i>P. coniforme</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-8}$	nicht notwendig
<i>Eugleninen.</i>			
<i>Euglena gracilis</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	$10^{-10}$
<i>E. grac. var. robusta</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-8}$	nicht notwendig
<i>E. viridis</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	$10^{-10}$
<i>Astasia longa</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	$10^{-11}$
<i>A. quartana</i> . . . . .	$10^{-5}$	$10^{-8}$	$10^{-10}$
<i>A. Chattoni</i> . . . . .	$10^{-6}$	$10^{-8}$	$10^{-10}$

gewiesen, daß die in Tabelle VI angegebenen Konzentrationen der einzelnen Spurenelemente tatsächlich optimal sind, da sie die gleichen Ernteerträge herbeiführen, wie sie in einer nicht vorbehandelten Lösung erzielt werden. Abschließend wird nochmals darauf hingewiesen, daß sämtliche Versuche mit Zusatz der jeweils am günstigsten wirkenden Aneurinmenge geschahen.

### Zusammenfassung.

Es wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen der Nähr-elemente auf die Vermehrung und Trockensubstanzbildung untersucht und für sämtliche Arten folgende Konzentrationen als optimal nachgewiesen:  $10^{-2}\%$  N,  $5 \cdot 10^{-3}\%$  K,  $2 \cdot 10^{-3}\%$  P,  $10^{-4}\%$  Mg,  $10^{-3}\%$  S,  $5 \cdot 10^{-4}\%$  Ca und  $5 \cdot 10^{-5}\%$  Fe. Dabei wird vorgeschlagen, in Zukunft die tatsächlich wirksame Menge des betreffenden Elementes anzugeben.

Ferner wurden verschiedene Kohleproben auf ihre Eignung zur Befreiung einer Mineralsalzlösung von Spurenelementen geprüft und in einer mit HCl und HNO<sub>3</sub> gewaschenen Lindenholzkohle die geeignetste Sorte gefunden. Eingehende Kulturversuche erbrachten dann den Nachweis der Notwendigkeit von Zn und Mn für sämtliche Arten, während As nur für sechs Arten notwendig ist. Die Ergebnisse erheben nicht den Anspruch, einen Nachweis aller notwendigen Spurenelemente erbracht zu haben, es besteht vielmehr die Möglichkeit, daß trotz Kohlebehandlung Elemente, die in sehr geringer Konzentration wirksam sind, nicht beseitigt wurden.

### Literatur.

*Bortels, H.*, Biochem. Zeitschr. **182**, 301, 1927. — *Feigl, F.*, Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. Leipzig 1935. — *Ondratschek, K.*, diese Zeitschr. **11**, 239, 1940; **12**, 46, 91, 229, 1941; Beih. Bot. Centralbl. **61**, Abt. A, 1941. — *Pirson, A.*, Zeitschr. f. Bot. **31**, 193, 1937. — *Roberg, M.*, Centralbl. f. Bakter., Abt. II, **74**, 333, 1928; **84**, 196, 1931. — *Schopfer, W. H.*, Ergebni. d. Biol. **16**, 1, 1939.

---

(Aus dem Institut für physiologische Botanik der Universität Uppsala.)

## Über das Wuchsstoffbedürfnis von *Boletus granulatus* (L.) Fr.

Von

Elias Melin und Birgitta Nyman.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Juni 1941.)

In einer früheren Mitteilung (*Melin und Nyman, 1940*) haben wir nachgewiesen, daß die Wachstumsgeschwindigkeit des als Mykorrhizapilzes bei Nadelbäumen bekannten Hymenomyceten *Boletus granulatus* (L.) Fr. bei Züchtung in synthetischer Nährösung durch Aneurinzufuhr beschleunigt wird. Ob Aneurin auch die Größe der Mycelbildung beeinflußt, konnte durch die damals ausgeführten Versuche nicht festgestellt werden. Indes wurde als bemerkenswert hervorgehoben, daß der bei den Versuchen benutzte Stamm sich auch ohne Zusatz von Wuchsstoff verhältnismäßig kräftig in synthetischer Nährösung entwickelte, was für die Fähigkeit des Stammes sprach, Aneurin zu synthetisieren.

Um den Aneurinbedarf von *Boletus granulatus* näher zu untersuchen, wurden Versuche mit suboptimalen Mengen Aneurin gemacht (*Fries, 1938*). Im Anschluß an diese Versuche wurde der Einfluß der Thiazol- und der Pyrimidinkomponente des Aneurins auf das Wachstum untersucht<sup>1</sup>. Als Versuchsmaterial dienten drei verschiedene Stämme A, B und C, die alle in Reinkultur von Gewebestücken junger Fruchtkörper erhalten worden waren. Der A-Stamm, den wir auch bei unseren früheren Versuchen verwandt hatten (*Melin und Nyman, 1. c.*) wurde 1938 isoliert (Fruchtkörper von Läbyvad bei Uppsala), der B-Stamm 1940 (Fruchtkörper von Bärby bei Uppsala) und der C-Stamm 1939 (Fruchtkörper aus dem Stadtpark von Uppsala).

Die Kulturen wurden in 100-cem-Erlenmeyerkolben (Jenaglas) angelegt, die mit 20 cem Nährösung beschickt worden waren. Diese hatte folgende Zusammensetzung (*Melin und Lindeberg, 1939, S. 243*):

Glykose .....	10 g	Mg SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
NH <sub>4</sub> -Tartrat .....	1,0 g	FeCl <sub>3</sub> (1%ige Lösung) ...	10 Tropfen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g	Aqua dest.....	1000 cem

<sup>1</sup> Unter Thiazol und Pyrimidin wird in dieser Veröffentlichung 4-Methyl-5-β-Hydroxyäthylthiazol und 2-Methyl-4-Amino-5-Aminomethyl-Pyrimidin verstanden. Diese Präparate — ebenso wie auch das Aneurin — wurden von der Firma *Merck* in Darmstadt bezogen.

Die Impfstämme wurden in Petrischalen auf Nähragar von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

Glykose .....	5,0 g	FeCl <sub>3</sub> (1%ige Lösung) ...	10 Tropfen
NH <sub>4</sub> Cl .....	0,5 g	Malzextrakt .....	5,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g	Agar-Agar .....	15,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O ..	0,5 g	Aqua dest.....	1000 ccm

Bezüglich der Methodik im übrigen verweisen wir auf unsere frühere Arbeit (Melin und Nyman, l. c.).

Die Kulturen wurden bei 25° C gehalten. Die angegebenen Mycel-trockengewichte sind Mittelwerte von sechs Kulturen.

### Aneurin in suboptimalen Konzentrationen.

Die Stämme A und B wurden in der angegebenen Nährösung mit Zusatz von 10 und 20 my Aneurin gezüchtet, das nach dem Autoklavieren zugesetzt wurde. Der Verlauf der Mycelbildung ergibt sich aus den Tabellen I und II sowie aus Abb. 1 und 2. Ohne Aneurin entwickelte sich Stamm A langsam während der ersten 30 Tage. Hierauf nahm das

Tabelle I. Das Wachstum von *Boletus granulatus* (L.) Fr., Stamm A, in Nährösung mit 10 und 20 my Aneurin.

Versuchszeit in Tagen	Ohne Aneurin		10 my je Kolben bei Beginn des Versuches		20 my je Kolben bei Beginn des Versuches	
	Trocken- gewicht mg	pH	Trocken- gewicht mg	pH	Trocken- gewicht mg	pH
10	0,9	5,5	2,1	5,3	1,6	5,3
20	1,7	5,3	5,3	4,8	6,3	4,8
30	3,9	4,9	14,4	4,2	15,6	4,1
40	11,7	4,3	20,3	3,6	28,8	3,5
50	18,2	3,7	20,8	3,4	29,3	3,3
80	16,3	3,8	22,7	3,5	24,3	3,5
50 + 30*	28,8	4,3	29,0	4,2	40,0	4,0

\* Nach 50 Tagen wurde das pH zu 5,5 reguliert.

Wachstum ziemlich stark zu, und nach 50 Tagen betrug das Mycel-trockengewicht 18,2 mg. Dabei hatte sich die Wasserstoffionenkonzentration der Kulturflüssigkeit von pH 5,5 auf pH 3,7 verschoben, wodurch ein weiteres Wachstum unmöglich gemacht worden zu sein scheint. Nach Untersuchungen von O. Modess<sup>1</sup> im hiesigen Laboratorium ist die Mycelerzeugung bei *B. granulatus* in Flüssigkeitskultur von der Wasserstoffionenkonzentration stark abhängig und am größten bei einem pH von etwa 5,0. In einer Anzahl Kolben wurde das pH der Nährösung nach 50 Tagen auf 5,5 gestellt, was erneutes Wachstum

<sup>1</sup> Unveröffentlicht.

zur Folge hatte. Nach 80 Tagen betrug das Myceltrockengewicht in diesen Kolben 28,8 mg.

Bei dem Versuch mit 10 my Aneurin verlief das Wachstum anfangs schneller als bei dem Versuch ohne Aneurin. Nach 50 Tagen war indes das Myceltrockengewicht nur unbedeutend größer als bei Fehlen von Aneurin.

Mit 20 my wurde nach 40 Tagen ein Myceltrockengewicht von 28,8 mg erreicht, worauf das Wachstum zum Stillstand kam, wahr-

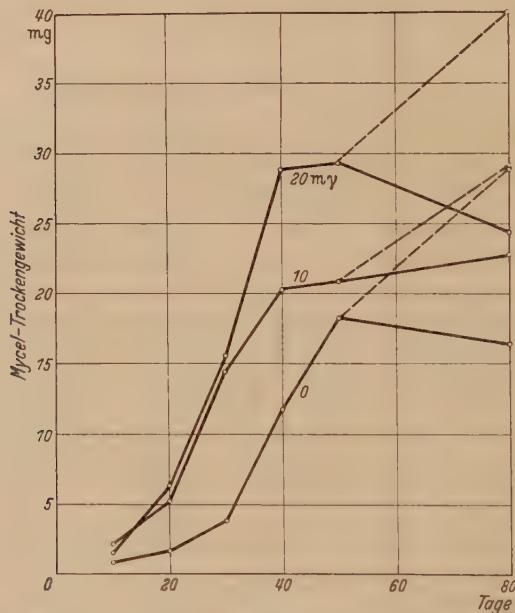


Abb. 1. Das Wachstum von *Boletus granulatus*, Stamm A, in Nährlösung ohne und mit Aneurin (die gestrichelte Linie: Wachstum nach Regulierung des  $p_H$  der Nährlösung zu 5,5).

Tabelle II. Das Wachstum von *Boletus granulatus* (L.) Fr., Stamm B, in Nährlösung mit 10 und 20 my Aneurin.

Versuchszeit in Tagen	Ohne Aneurin		10 my je Kolben bei Beginn des Versuches		20 my je Kolben bei Beginn des Versuches	
	Trocken- gewicht mg	$p_H$	Trocken- gewicht mg	$p_H$	Trocken- gewicht mg	$p_H$
10	0,9	5,3	2,6	4,9	3,3	4,8
20	0,7	5,3	5,5	4,4	—	—
30	1,4	5,0	8,7	3,9	7,8	3,9
40	1,1	5,0	7,9	3,9	23,0	3,3
70	1,8	4,9	8,9	4,0	12,7	3,5
40 + 30*	—	—	23,8	4,0	25,3	4,0

\* Nach 40 Tagen wurde das  $p_H$  zu 5,5 reguliert.

scheinlich infolge der hohen Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung. Nachdem die Nährlösung nach 50 Tagen auf  $p_H$  5,5 gestellt worden war, erhielt man nach weiteren 30 Tagen ein Myceltrockengewicht von 40,0 mg.

Stamm B entwickelte sich in den Kontrollkolben ohne Aneurin sehr langsam: nach 70 Tagen betrug das Myceltrockengewicht nur 1,8 mg. Bei 10 und 20 my Aneurin betrug das Myceltrockengewicht nach 40 Tagen 7,9 bzw. 23,0 mg. Nach Regulierung des  $p_H$  der Nähr-

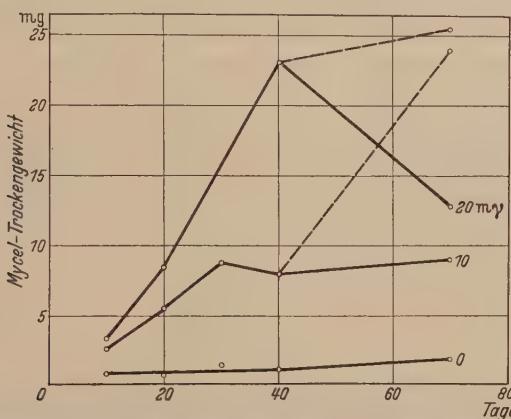


Abb. 2. Das Wachstum von *Boletus granulatus*, Stamm B, in Nährösung ohne und mit Aneurin (die gestrichelte Linie: Wachstum nach Regulierung des  $p_H$  der Nährösung zu 5,5).

lösung bis zu 5,5 stieg die Mycelbildung in den Kolben mit 10 my Aneurin im Verlauf von weiteren 30 Tagen auf 23,8 mg. In den 20-my-Kolben trat dagegen kein erneutes Wachstum ein. Die Ursache hiervon muß dahingestellt bleiben.

Aus den Versuchen geht hervor, daß sich Stamm A von *Boletus granulatus* in synthetischer Nährösung ohne Aneurinzufuhr entwickeln kann. Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde indes durch Zusatz von Aneurin gesteigert, was zu zeigen scheint, daß die Fähigkeit des Stammes, selbst Aneurin zu synthetisieren, beschränkt war. Hinsichtlich seines Bedarfs an Aneurin aus dem Substrat scheint dieser Stamm mit *Lenzites saepiaria* (Fries, 1938) vergleichbar zu sein, welche Art Fries (l. c.) als relativ aneurinbedürftig bezeichnet.

Stamm B verhielt sich anders als Stamm A. Ohne Aneurin zeigte er nämlich ein so unbedeutendes Wachstum, daß er unter den gegebenen Verhältnissen als absolut aneurinbedürftig (sensu Fries) zu betrachten sein dürfte. Falls der Stamm ein schwaches Vermögen zur Synthesierung von Aneurin hatte, war dieses jedenfalls so herabgesetzt, daß es praktisch für das Wachstum bedeutungslos war.

### Pyrimidin und Thiazol.

Nachdem 1937 erstmalig nachgewiesen worden war (Knight, 1937; Sinclair, 1937; Schopfer und Jung, 1937; Robbins und Kavanagh, 1937), daß das Aneurin durch seine Komponenten Pyrimidin und Thiazol ersetzt werden kann, sind bekanntlich zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß der Aneurinkomponenten auf niedere und höhere Pflanzen ausgeführt worden. Im letzten Jahr haben wir die Wirkung dieser Stoffe auf die Mykorrhizapilze der Bäume untersucht. Hier sollen nur die Ergebnisse bei *Boletus granulatus* mitgeteilt werden. Als Versuchsstoffe dienten die Stämme B und C. Von den Wuchsstoffen wurde 1 γ je Kolben zugesetzt. Die Versuche dauerten 30 Tage.

Tabelle III. Einfluß von Pyrimidin und Thiazol auf das Wachstum von *Boletus granulatus* (L.) Fr., Stamm B. Versuchszeit 30 Tage.

Zusatz je Kolben	Mycel-Trockengewicht mg	pH am Ende des Versuches
Kontrolle .....	1,0 ± 0,3	5,0
1 γ Pyrimidin .....	2,5 ± 1,0	4,7
1 γ Thiazol .....	1,0 ± 0,5	5,2
1 γ Pyrimidin + 1 γ Thiazol .....	31,9 ± 0,4	3,1
1 γ Aneurin .....	31,4 ± 0,2	3,1

Der aneurinbedürftige Stamm B (Tabelle III) zeigte in den Kontrollkolben unbedeutendes Wachstum: nach 30 Tagen betrug das Mycelgewicht 1,0 mg. Ein Zusatz von nur Pyrimidin oder nur Thiazol beschleunigte das Wachstum nicht. Dagegen lieferten Pyrimidin und Thiazol zusammen dasselbe Mycelgewicht wie Aneurin. Der Versuch zeigt also, daß das Aneurin durch seine beiden Komponenten ersetzt werden kann. *Boletus granulatus* gehört in dieser Hinsicht zu dem Typus von *Phycomyces* und *Staphylococcus aureus* (Schopfer, 1939).

Tabelle IV. Einfluß von Pyrimidin und Thiazol auf das Wachstum von *Boletus granulatus* (L.) Fr., Stamm C. Versuchszeit 30 Tage.

Zusatz je Kolben	Mycel-Trockengewicht mg	pH am Ende des Versuches
Kontrolle .....	4,7 ± 0,7	4,1
1 γ Pyrimidin .....	6,7 ± 0,5	3,9
1 γ Thiazol .....	7,9 ± 1,9	3,9
1 γ Pyrimidin + 1 γ Thiazol .....	43,9 ± 2,2	2,9
1 γ Aneurin .....	40,2 ± 3,1	2,9

Die Mycelerzeugung bei Stamm C (Tabelle IV) betrug in den Kontrollkolben 4,7 mg nach 30 Tagen, was darauf hindeutet, daß sich dieser Stamm hinsichtlich seines Aneurinbedarfs ebenso verhält wie

Stamm A. Pyrimidin und Thiazol hatten zusammen die gleiche Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit wie Aneurin. Je für sich scheinen Pyrimidin und Thiazol dagegen keinen Einfluß ausgeübt zu haben.

### Zusammenfassung.

1. Der Aneurinbedarf zweier Stämme von *Boletus granulatus* (L.) Fr. wurde in synthetischer Nährlösung untersucht, wobei der Verlauf der Mycelerzeugung  $2\frac{1}{2}$  Monate lang verfolgt wurde.
2. Die beiden Stämme verhielten sich hinsichtlich ihres Bedarfs an Aneurin verschieden. Der eine entwickelte sich in synthetischer Nährlösung ohne dieses Vitamin, während der andere ohne Aneurin praktisch kein Wachstum zeigte.
3. Verschiedene Stämme von *Boletus granulatus* können sich also hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Synthesierung von Aneurin ungleich verhalten.
4. Die Pyrimidin- und die Thiazolkomponente des Aneurinmoleküls übten zusammen die gleiche Wirkung auf das Wachstum aus wie Aneurin. Je für sich beeinflußten Pyrimidin und Thiazol das Wachstum nicht.

### Literatur.

*Fries, N.*, Symb. Bot. Ups. III, 2, Upsala 1938. — *Knight, B. C. J. G.*, Biochem. J. 31, 966, 1937. — *Melin, E.*, u. *G. Lindeberg*, Bot. Notiser 1939, S. 241. — *Melin, E.*, u. *B. Nyman*, diese Zeitschr. 11, 318, 1940. — *Robbins, W. J.*, u. *F. Kavanagh*, Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A. 23, 499, 1937. — *Schopfer, W. H.*, Ergebn. d. Biologie 16, 1, 1939. — *Schopfer, W. H.*, u. *A. Jung*, C. r. Acad. Sci. Paris 204, 1500, 1937. — *Sinclair, H. M.*, Nature (London) 140, 360, 1937.

(Dal Laboratorio di Microbiologia Agraria e Tecnica della Facoltà Agraria  
della Regia Università di Perugia.)

## Una nuova specie di *Saccharomycodes*: *Saccharomycodes bisporus*.

Per

Tommaso Castelli.

Con 5 figure nel testo.

(*Ein eingangen am 27. Juni 1941.*)

Proseguendo nelle indagini sugli agenti della fermentazione vinaria nelle varie regioni italiane (1, 2, 3) riferisco nella presente nota lo studio di identificazione di una forma di *Saccharomycodes* isolata da *Santarelli* (4) nelle sue ricerche sugli agenti della fermentazione vinaria nella zona dei colli romani. Le ricerche del *Santarelli*, eseguite in questo laboratorio colle modalità ormai da noi ben stabilite, sono state rivolte su 22 mosti prelevati in varie località dei colli romani durante la vendemmia del 1939. Dai detti 22 mosti, esaminati sia all'inizio come al termine della fermentazione tumultuosa, vennero isolate complessivamente 196 culture blastomicetiche delle quali tre dovevano riportarsi al genere *Saccharomycodes Hansen*. Nel corso dello studio di identificazione apparve subito che i tre stipiti dovevano considerarsi come appartenenti a due diverse forme e pertanto ho creduto opportuno sottoporli ad un'accurata ricerca la quale ha chiaramente dimostrato che se due degli stipiti si debbono ritenere identici alla forma indicata da *Hansen* come *Saccharomycodes Ludwigii*, l'altro, per presentare notevoli differenze deve considerarsi come una specie a se, non ancora segnalata. In una brevissima comunicazione alla seduta di Perugia della Società di Biologia Sperimentale (5) ho chiamato detta forma come *Saccharomycodes bisporus*. Non intendo riportare la tecnica seguita nello studio poichè essa corrisponde a quella stabilita dalla *Stelling Dekker* (6) ed è riferita estesamente negli altri miei citati lavori.

Lo studio di identificazione della forma di cui tratta la presente nota è stato eseguito parallelamente ad uno stipite bene identificato di *Saccharomycodes Ludwigii*.

Inizio col riferire i caratteri microscopici.

Nel mosto d'uva come nell'infuso di malto dopo 24 ore a 25° si osservano cellule limoniformi, apiculate, e cellule tipiche a forma di suola di scarpa. Le dimensioni medie sono di 12—15—20  $\times$  6—9  $\mu$ . Le cellule sono gemmate, isolate o riunite a due-tre. Dopo tre giorni sia la forma, le dimensioni, come gli aggruppamenti cellulari non presentano nulla di diverso.

Il microrganismo è stato coltivato anche in *altri terreni liquidi* (decotto di grano-decotto di fagioli e brodo di carne con aggiunta dell' 1 % di zucchero); l'aspetto e le dimensioni osservate sono però del tutto simili a quelle notate nel mosto d'uva.

Nell'*agar di malto* dopo 3 giorni a 25° si notano cellule di forma globos-ovale, ma per lo più ristrette agli estremi si da ricordare una suola di scarpa. Le cellule si presentano isolate o riunite a 2-3. Si notano aschi partenogenetici contenenti due spore globose a pareti liscie. Le dimensioni delle cellule sono varie; in lunghezza esse arrivano a 17-20  $\mu$ , in media 12-16  $\mu$ , per una larghezza media di 6-8  $\mu$ . Le spore hanno il diametro medio di 4,2-4,4  $\mu$ .

In confronto al tipico *Saccharomycodes Ludwigi* la forma che si descrive non presenta cellule molto lunghe e strette e riunite a catene di molti elementi. Invecchiando la cultura non cambiano sia l'aspetto come le dimensioni delle cellule, forse si notano catene formate di 5-6 elementi. Gli aschi si fanno sempre più numerosi però contengono sempre due sole spore. Spesso si osservano catene costituite da 5-6 elementi tutti sporificati.

Tra i *terreni solidi* è stato usato anche l'*agar di carota* e dischi di carota e di patata posti in scatole Petri. In tutti questi terreni di cultura sia l'aspetto come le dimensioni delle cellule e delle spore sono risultati perfettamente identici a quelli riferiti per l'*agar di malto*.



Fig. 1. *Saccharomycodes bisporus*. Cultura sporificata; si osservano cellule ed aschi (Ingrand. ca. 2000).

Nel *mosto d'uva* come nel malto si nota dapprima intorbidamento, poi produzione di gas e successivamente deposito al fondo; molto tardivamente compare una traccia di anello superficiale.

Nell'*agar di malto*, nell'*agar di carota*, nella carota e nella patata si osservano patine abbondanti, mucose, liscie, dapprima di colore bianco grigio e nell'invecchiamento tendenti al giallognolo.

Per disseminazione su *gelatina di mosto* dopo 5 giorni a 18° si osservano colonie rotonde, gibbose, a margini interi e lisci, non fondenti la gelatina. Nell'agar di malto le culture d'isolamento per spandimento mostrano dopo 48 ore a 25° colonie rotonde, piatte a margini lisci, di consistenza mucosa e di colore bianco-grigio.



Fig. 2. *Saccharomyces bisporus*. Cultura spotificata; si osservano cellule ed aschi (Ingrand. ca. 1500).

*L'infissione in gelatina* di mosto dopo due mesi a 18° mostra sviluppo a chiodo con testa rilevata e screpolata e crescita anche lungo il canale d'innesto. La gelatina non è minimamente fluidificata ma si presenta fortemente fessurata in seguito alla produzione di gas.



Fig. 3. *Saccharomyces bisporus*. Cultura sporificata; asco unisporoso ed asco bisporeo (Ingrand. ca. 1500).

sporificazione eseguiti si è sempre osservato che ogni asco contiene quasi sempre due e mai più di due spore (v. fig. 1-3). Per contro le culture di *Saccharomyces Ludwigi*, coltivate sugli stessi terreni, hanno dimostrato di formare aschi costantemente tetrasporei.

La *colonia gigante* (v. fig. 4) è stata allestita su gelatina al mosto d'uva sia per la forma in questione quanto per il *Saccharomyces Ludwigi*. Dopo due mesi a 16° le colonie giganti dei due blastomiceti non presentano forti differenze; in ambedue si nota una colonia rotonda con diametro di poco più di un centimetro con ampio cratero centrale a forma di imbuto. Nella colonia gigante del *Saccharomyces Ludwigi* i solchi e le rilevatezze sono abbastanza marcate e da queste si va ad i bordi che si presentano lobati per formazione di grossi mammelloni (v. fig. 5), la gelatina si presenta normale. Il colorito della colonia è bianco giallastro. Nello stipite in considerazione invece i solchi del cratero sono meno marcati ma i bordi della

I saggi di *sporificazione* sono stati eseguiti con cura particolare; allo scopo sono stati usati i seguenti terreni di cultura (agar malto, agar carota, agar Gorodkowa, agar al decotto di grano, blocchetti di gesso-silice gelatinosa, carota e patata) incubando a 25°. La sporificazione è facile ad ottersi in tutti i terreni solidi ricordati ed è particolarmente rapida sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa. La sporificazione è sempre partenogenetica. La percentuale delle cellule che si trasforma in asco è elevatissima, a volte in un campo microscopico si osservano quasi tutte cellule sporificate. In tutti i saggi di

colonia sono più intensamente lobati ed i lobi presentano finissime zigrinature. Anche il colore è diverso da quello della colonia gigante del *Saccharomycodes Ludwigii*, esso è infatti di un bianco sporco-grigio. Anche per questo stipite non si nota minima traccia di liquefazione.

La fermentabilità degli zuccheri è stata ricercata su tubi Durham e sulle provette Einhorn in brodo di carne coll'aggiunta del 2% dei rispettivi zuccheri. Quanto lo stipite descritto come il *Saccharomycodes Ludwigii* hanno dimostrato capacità a fermentare glucosio-levulosio-mannosio e saccarosio; la forma in studio è capace di fermentare anche il raffinosio ma soltanto per 1/3.

L'assimilazione dei nitrati si è dimostrata negativa.



Fig. 4. *Saccharomycodes bisporus*.  
Colonia gigante su gelatina di mosto  
dopo 60 giorni a 16° (Ingrand. ca. 4).

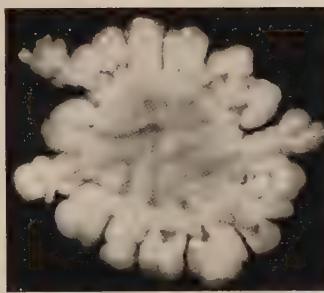


Fig. 5. *Saccharomycodes Ludwigii*.  
Colonia gigante su gelatina di mosto  
dopo 60 giorni a 16° (Ingrand. ca. 4).

La crescita in presenza di alcool etilico quale unica sorgente idrocarbonata ha mostrato sviluppo ottimo.

Nel vino ottenuto seminando il germe su mosto d'uva sterile ed esaminato a fermentazione ultimata sono state trovate quantità discrete di acidità volatile (0,52%<sub>00</sub>) e piuttosto forti di acetoina, dette quantità sono però notevolmente minori di quelle riscontrate nello stesso mosto seminato con *Saccharomycodes Ludwigii*.

La descrizione data dimostra chiaramente che lo stipite in studio diversifica sostanzialmente dal *Saccharomycodes Ludwigii* sia per una leggera differenza di forma delle cellule, sia perchè l'asco non contiene mai più di due spore, come per alcuni caratteri della colonia gigante e per la capacità a fermentare per 1/3 il raffinosio. Ma ben più marcate risultano le differenze allorchè si confrontano le modalità di germinazione delle ascospore. È noto che in *Saccharomycodes Ludwigii* le quattro spore prima di germinare coniugano a due a due e che questo fatto è quasi generale in detta specie. La germinazione delle ascospore nello stipite descritto avviene invece in maniera del tutto particolare. È stata potuta seguire la germinazione portando in mosto d'uva pochissimi aschi e servendosi della cameretta di Böttcher sul fondo della quale era stata posta dell'acqua ed unendo il vetrino coprioggetto mediante molta vasellina onde la goccia non avesse a prosciugarsi. La germinazione

delle spore è stata seguita in ambiente a 25°; essa si manifesta colle seguenti modalità. Le due spore che dapprima appaiono ben distinte l'una dall'altra, si fanno man mano meno osservabili; il contenuto di esse tende a farsi più trasparente e l'episporio ad assottigliarsi. Detti fatti tendono sempre più a progredire finchè ad un dato momento l'asco si presenta come diviso in due loculi separati da una sottile linea di demarcazione. Successivamente anche questo setto viene riassorbito e l'asco è così trasformato in una cellula che presenta finissime granulazioni e che si riproduce normalmente per gemmazione. In poche parole la germinazione delle spore è preceduta dal riassorbimento completo delle pareti con un processo del tutto inverso a quello che si osserva nella trasformazione della cellula in asco. La germinazione delle spore è stata sagggiata moltissime volte e le modalità osservate sono state sempre le medesime. Per contro la germinazione di spore di *Saccharomyces Ludwigi*, eseguita parallelamente e colle stesse norme dello stipite descritto, si è sempre manifestata con la coniugazione di due spore e successiva gemmazione.

Nello stipite descritto si ha quindi una fusione delle due ascospore ma questo fatto non ha nulla in comune con ciò che si verifica in *Saccharomyces Ludwigi* e un simile comportamento è più prossimo anzi alle modalità di germinazione delle spore nelle specie del genere *Saccharomyces*. A questo riguardo si può avvertire che anche la forma della colonia gigante è forse più vicina a quella di alcune specie di *Saccharomyces* anzichè a quella del *Saccharomyces Ludwigi*.

Il riferimento della forma descritta è molto semplice. Le cellule tipicamente apiculate o a forma di suola di scarpa e le modalità di formazione degli aschi fanno riportare il germe in studio indiscutibilmente al genere *Saccharomyces*. In questo genere oggi viene riportato soltanto il *Saccharomyces Ludwigi* perchè la specie isolata da *Roux* (7) e descritta da *Klöcker* come *Saccharomyces Behrensi* non è reperibile. D'altronde il *Saccharomyces Behrensi* avrebbe posseduto caratteri morfologici e biochimici ben differenti da quelli del germe in questione. Siccome le differenze tra il mio *Saccharomyces* e il *Saccharomyces Ludwigi* sono ben evidenti e riguardano diversi caratteri, ritengo opportuno considerare il mio stipite come una specie non ancora segnalata per la quale propongo il nome di *Saccharomyces bisporus* e della quale riporto una breve diagnosi.

*Saccharomyces bisporus n. sp.*

Cellule globose ovali ma per lo più apiculate o a tipica forma di suola di scarpa riproducentesi per un processo intermedio tra la scissione e la gemmazione delle dimensioni medie di 12—15—20 · 7—9  $\mu$ . Nel mosto d'uva e nel malto si ha dapprima intorbidamento, indi fermenta-

zione attiva e poi deposito e traccia di anello superficiale. La sporificazione è facile e partenogenetica. Le spore sono rotonde a parete liscia, quasi sempre due e mai più di due per asco, delle dimensioni di 4,2—4,4  $\mu$ . La germinazione delle ascospore non è preceduta da coniugazione. Fermentazione del glucosio-levulosio-mannosio-saccarosio e per 1/3 del raffinosio. La crescita in presenza di alcool etilico è buona e nulla l'assimilazione dei nitrati. La colonia gigante si presenta con cratere centrale e bordi sinuosi finemente zigrinati. Le patine di vecchie culture su agar malto sono lisce, mucose di colore grigio giallognolo. La liquefazione della gelatina è negativa. In mosto d'uva è capace di produrre il 10,33 % di alcool in volume, 0,52% di acidità volatile e quantità sensibili di acetoina.

### Riassunto.

Viene descritta una nuova specie di *Saccharomycodes* isolata dai mosti dei colli romani durante la vendemmia del 1939 che viene indicata come *Saccharomycodes bisporus* n. sp.

### Zusammenfassung.

Es wird eine neue Art von *Saccharomycodes* beschrieben, die aus dem Most der romanischen Hügel im Herbst 1939 isoliert wurde und die Bezeichnung *Saccharomycodes bisporus* n. sp. erhält.

### Bibliografia.

- 1) *G. de' Rossi*, Rel. IV<sup>o</sup> Con. Int. della Vigna e del Vino. Lausanne 1935, 1. — 2) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'agricoltura **19**, 47, 1939. — 3) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'agricoltura **19**, 85, 1939. — 4) *B. Santarelli*, Ricerche di prossima pubblicazione. — 5) *T. Castelli*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **3**, 196, 1941. — 6) *N. M. Stelling-Dekker*, Die sporogenen Hefen. Uitgave De Koninklijke Akad. Van Wetenschappen. Te Amsterdam 1931. — 7) *A. Klöcker* in *Lafar*, Handb. f. Techn. Mykol. **4**, 183, 1907.

(Aus dem Institut für physiologische Botanik der Universität Uppsala.)

## Über die Sporenkeimung bei einigen Gasteromyceten und mykorrhizabildenden Hymenomyceten.

Von

Nils Fries.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. Juli 1941.)

Die Arbeiten, die bisher über Genetik, Sexualität und Kernphasenwechsel der *Hymenomyceten* durchgeführt wurden, haben so gut wie ohne Ausnahme die Verhältnisse bei gewissen koprophilen und ligniphilen Gruppen behandelt (vor allem den Gattungen: *Coprinus*, *Panaeolus*, *Stropharia* und *Psathyrella* bzw. *Hypholoma*, *Pholiota*, *Oollybia*, *Schizophyllum*, *Lenzites*, *Polyporus*, *Trametes*, *Fomes*, *Stereum* und *Corticium*). Die ökologisch sehr wichtige Gruppe, welche die humusbewohnenden Mykorrhizabildner darstellen und die, wenn auch nicht die meisten, doch einen sehr großen Teil aller bekannten *Hymenomyceten*-Arten umfaßt, wurde hingegen nicht in den genannten Beziehungen untersucht. (Hierzu gehören u. a. die Gattungen *Amanita*, *Tricholoma*, *Clitopilus*, *Entoloma*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Cortinarius*, *Russula*, *Lactarius*, *Cantharellus*, *Paxillus* und *Boletus*.) Der Grund dieses Verhaltens ist einfacher Natur. Was Untersuchungen der fraglichen Art betrifft, so ist es nämlich notwendig, der Entwicklung des Pilzes von der keimenden Spore an zu folgen oder wenigstens Einspormycel zur Verfügung zu haben. Trotz zahlreicher Versuche bis von der Mitte des vorigen Jahrhunderts an war man indessen noch nicht imstande, unter kontrollierten Bedingungen Keimung bei Sporen von mykorrhizabildenden *Hymenomyceten* hervorzurufen (vgl. Melin 1936).

Ebenso verhält es sich hinsichtlich der den *Hymenomyceten* nahestehenden *Gasteromyceten*. Nur bei den hauptsächlich auf Holz wachsenden *Nidulariaceen* sowie bei *Sphaerobolus* kann man mit Sicherheit die Sporen zur Keimung bringen, während dagegen alle andern bisher erprobten *Gasteromyceten* allen Anstrengungen in dieser Richtung trotzten oder einzelne geglückte Versuche später niemals wiederholt werden konnten.

Über das Problem der Sporenkeimung bei den erwähnten Pilzgruppen läßt sich also sagen, daß es in gewissem Maße eine Schlüsselstellung in der Hinsicht einnimmt, daß erst durch dessen Lösung die Möglichkeit der Klarlegung einer Reihe wichtiger Fragen über viele unserer häufigsten Pilze entsteht. Dessen ungeachtet kann man gleich-

wohl annehmen, daß eine Analyse des offenbar sehr komplizierten keimungsphysiologischen Problems, das hier vorliegt, auch Ergebnisse von allgemeinem physiologischen Interesse zu liefern vermag.

Bevor ich zum Bericht über meine eigenen Untersuchungen schreite, will ich zunächst eine kurze Übersicht über die wichtigsten Arbeiten geben, die bisher über die Sporenkeimung bei *Gasteromyceten* und mykorrhizabildenden *Hymenomyceten* veröffentlicht wurden.

### Literaturübersicht.

*Nidulariineae* bildet die einzige *Gasteromyceten*-Gruppe, wo die Sporen ohne Schwierigkeit zur Keimung gebracht werden können. Geglückte Keimungsversuche mit Vertretern dieser Gruppe (*Crucibulum vulgare* und *Cyathus striatus*) wurden bereits früh unternommen und seitdem oft wiederholt (*Hoffmann* 1859, *Hesse* 1876, *Eidam* 1877, *Brefeld* 1877, *Leininger* 1915 u. a.).

Größere Schwierigkeiten bot *Sphaerobolus*, gewöhnlich zur Gruppe *Sclerodermatinae* gerechnet. Ältere Angaben über Keimung bei diesem Pilz betreffen unzweifelhaft die leichter keimbaren Oidien, die sich in großer Menge im Fruchtkörper bilden (*Corda* 1842, *Pitra* 1870, *Fischer* 1884), während die Basidiosporen hier besondere Keimungsbedingungen fordern (*Pillay* 1923, *Lorenz* 1933). Bei dem ebenfalls zu *Sclerodermatinae* gehörenden *Pisolithus* behauptet *Bruns* (1894) eine sehr spärliche Keimung beobachtet zu haben. Da der Versuch offensichtlich nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde und insgesamt nur „2 oder 3“ Sporen als keimend zu sehen waren, dürfte eine gewisse Zurückhaltung am Platze sein.

Die häufigen und in reichem Maße sporenbildenden Stäublinge und andere Vertreter der Gruppe *Lycoperdinae* wurden von verschiedenen Forschern behandelt. *Hoffmann* (1859) behauptete zwar, Sporenkeimung bei einer *Bovista*-Art und drei *Lycoperdon*-Arten beobachtet zu haben, indessen stellt er in einer Arbeit vom folgenden Jahr (1860) in eigentümlichem Gegensatz hierzu fest, daß alle Versuche mit *Lycoperdon*-Sporen mißglückten. In größeren, zusammenfassenden Arbeiten konstatieren auch sowohl *de Bary* (1884) als *Brefeld* (1877, 1908), daß Sporenkeimung bei einem Vertreter für *Lycoperdinae* niemals zu bemerken war. In einer umfassenden und gründlichen keimungsphysiologischen Untersuchung stellte *Ferguson* (1902) u. a. mit drei *Lycoperdon*-Arten und *Calvatia cyathiforme* Versuche an, und 10 Jahre später bemühte sich *Cool* (1912) in langwierigen Versuchen Keimung bei *Lycoperdon*-Arten, *Bovista nigrescens* und *Geaster* sp. zu erreichen. Es wurden jedoch in keiner von diesen Untersuchungen positive Ergebnisse erhalten. 1928 berichtet *Swartz*, daß er dadurch, daß er Sporen von *Lycoperdon pyriforme* abwechselnd anfeuchtete und trocknete, diese zum Keimen zu bringen vermochte. Es wurden nur frühe Keimungsstadien beobachtet und abgebildet. Spätere Versuche von *Kaufmann* (1934), der dieselbe Methodik anwandte, gaben völlig negative Ergebnisse.

Innerhalb der *Gasteromyceten*-Gruppen *Phallineae*, *Hymenogastrineae* und *Podaxineae* ließ sich niemals Sporenkeimung wahrnehmen (vgl. *de Bary* 1866, *Brefeld* 1908).

Nicht ganz so viele Untersuchungen wurden über die Keimungsverhältnisse bei mykorrhizabilidenden *Hymenomyceten* durchgeführt. *Brefeld* (1877, 1908) erwähnt mißglückte Versuche mit *Amanita* und *Boletus*. *Cool* (1912) versuchte gleichfalls ohne Erfolg Sporenkeimung bei Arten der Gattungen *Amanita*, *Russula*, *Lactarius*, *Cortinarius* und *Boletus* zu bewirken. *Levine* (1913) erprobte mit dem gleichen Ergebnis neun verschiedene *Boletus*-Arten. Die einzige Angabe über Sporenkeimung bei *Boletus* liefert *Hammarlund* (1923), der während seiner zwölfjährigen Arbeiten mit *Boletus elegans* bei drei verschiedenen Gelegenheiten unter äußerst verschiedenartigen Bedingungen Keimung wahrnahm. Diese Keimungen traten offenbar vollkommen zufällig auf und ließen sich nicht wiederholen. Schließlich kann man hier *Vandendries*' (1933) Versuche mit u. a. *Amanita*, *Russula*, *Cortinarius* und *Boletus* erwähnen, die zu keinen positiven Ergebnissen führten.

### Einleitende Versuche.

Es war ursprünglich meine Absicht, im Herbst 1939 keimungsphysiologische Untersuchungen über eine Anzahl mykorrhizabilidende *Hymenomyceten* zu beginnen. Die Zeitumstände machten indessen die Verwirklichung dieses Planes unmöglich. Als ich später während des Winters Gelegenheit erhielt, die Arbeit wieder aufzunehmen, fand sich natürlich kein Material von den betreffenden Pilzen zur Verfügung. Ich entschloß mich daher, statt dessen Versuche mit einigen *Lycoperdon*-Arten anzustellen, bezüglich derer man ja Grund hatte zur Annahme, daß die Sporen ihr Keimvermögen wenigstens über einen Winter bewahrten. Das zu meiner Verfügung stehende Material bestand aus einigen trockenen Fruchtkörpern von *Lycoperdon umbrinum* Pers., *L. echinatum* Pers., *L. pratense* Pers. und *L. nigrescens* Pers., von denen die meisten bei Femsjö (Småland) während des Herbstes 1939 durch Herrn *Seth Lundell* eingesammelt wurden.

Die zahlreichen, vollständig ergebnislosen Keimungsversuche, die zuerst durchgeführt wurden, sollen hier nur in größter Kürze erwähnt werden. So wurden ohne jeden Erfolg eine große Anzahl verschiedener Agar- und Gelatinestrukturteile erprobt, die teils von mehr synthetischer Art waren, teils Extrakt verschiedener Art enthielten. Diese wurden in Petrischalen auf gewöhnliche Weise in Platten gegossen und die in Wasser aufgeschlämmten Sporen mittels einer Platin-Öse auf die Oberfläche aufgestrichen oder beim Gießen eingeschmolzen. Weiterhin fanden Versuche mit Pepsinbehandlung (nach *Pillay* 1923), Bestrahlung der Substrate mit ultraviolettem Licht (nach *v. Euler* 1925, *Bechmann* 1929, *Blank* und *Tiffney* 1936) sowie gründliche Auswaschung der Sporen statt, um diese von gegebenenfalls vorkommenden keimungshemmenden Stoffen zu befreien.

Ein besonderes Interesse glaubte ich der Methode „Trocknen — Anfeuchten“ widmen zu müssen, da diese mit Sicherheit die Keimung von *Myxomyceten*-Sporen begünstigt (*Jahn* 1905, *Gilbert* 1929 u. a.), und vor allem da *Swartz* (1928) als der einzige angibt, mittels dieser Verfahrensweise Sporenkeimung bei *Lycoperdon* induziert zu haben — lassen wir es dahingestellt, daß seine Ergebnisse später nicht durch *Kaufmanns* (1934) umfassendere Untersuchungen bekräftigt wurden.

Aufschlämmungen von *Lycoperdon*-Sporen in destilliertem Wasser oder in Lösungen verschiedener Art wurden auf steril placierten Uhrgläsern eintrocknen gelassen. Darauf wurde dest. Wasser zugesetzt, worauf eine neue Eintrocknung folgte usw., und diese Behandlung wurde mehrere Male wiederholt. Mit gleichmäßigen Zwischenräumen wurde das Aussehen der Sporen unter dem Mikroskop beobachtet, wobei mittels Platin-Öse Aufstreichungen auf Platten von verschiedenem Substrat vorgenommen wurden. Eine unter dem Mikroskop wahrnehmbare Veränderung der Sporen auf dem Uhrglas in Form einer Schwellung oder dgl. ließ sich in keinem Falle nachweisen. Die auf Platten aufgestrichenen Sporen blieben gleichfalls unverändert, und in der Regel sprossen rasch große Bakterien- und Hefekolonien aus sowie Mycel von verschiedenen gewöhnlichen Infektionspilzen. All dies rührte natürlich von den bereits im Fruchtkörper infizierten *Lycoperdon*-Sporen her.

Mitunter geschah es, daß auf Platten mit in eben genannter Weise aufgestrichenen *Lycoperdon*-Sporen keine Infektionsmycelien heranwuchsen, sondern die Sporen allmählich nur in große Bakterien- oder Hefekolonien eingebettet wurden. Auf einer Reihe derartiger Platten aus Malzagar (hier und im folgenden immer: 2,5% Malzextrakt + 1,5% Agar-Agar), wo das Sporenmaterial von einem Fruchtkörper von *Lycoperdon umbrinum* stammte, beobachtete ich nach 4 Wochen einzelne langsam und hauptsächlich submers wachsende, ziemlich dünne Hyphen, die aus gewissen Bakterienkolonien hervordrangen. Nachdem sie ein paar Millimeter in den reinen Malzagar gewachsen waren, konnten Isolierungen auf Röhrchen hergestellt werden. Es entwickelte sich Mycel vom *Basidiomyceten*-Typ, und dieses zeigte nach Aussehen und Wachstumsweise Übereinstimmung mit Gewebekulturen von *Lycoperdon*-Arten.

Es erschien mir nicht allzu kühn, mit der Möglichkeit rechnen zu dürfen, daß die isolierten Mycelien aus *Lycoperdon*-Sporen entstanden waren, die auf den infizierten Platten gekeimt hatten. Mit vollständiger Gewißheit konnte indessen erst dann gerechnet werden, nachdem die Keimung unter dem Mikroskop beobachtet worden war.

Der Umstand, daß die vermeintlichen Mycelien immer aus Bakterienkolonien oder gemischten Bakterien- und Hefekolonien hervorwuchsen, ließ darauf schließen, daß die Keimung durch die Tätigkeit vorhandener Organismen induziert wurde. Diese Annahme konnte recht bald zum Beweis erhoben werden. Bakterien, Hefen und eine Reihe hyphenbildender Pilze wurden von den infizierten Platten isoliert und deren Einwirkung auf die Keimung der Sporen von *Lycoperdon umbrinum* näher untersucht. Ein Bakterienstamm und einige Pilzmycelien (u. a. ein im folgenden erwähnter „*Int.-Pilz A*“) besaßen eine — wenn auch recht schwache — anregende Wirkung auf die Keimung. Von einer Reihe bekannter Pilze (aus Prof. E. Melins Stammkulturen), die ebenfalls für den gleichen Zweck erprobt wurden, ließ

sich eine kräftige Wirkung durch u. a. *Torula Suganii Okunuki* und *Torulopsis sanguinea (Scimon) Cif. et Red.* erhalten und eine bedeutend schwächere durch u. a. *Trichosporium heteromorphum Nannf.* und *Cladosporium sp.* Die kräftigste Wirkung wurde jedoch durch eine Wildhefe (im folgenden „*Hefe X*“ genannt) erreicht, die bei der Züchtung auf Malzagar Keimung bei *Lycoperdon*-Sporen hervorzurufen vermochte, und zwar nicht nur in der Hefekolonie selbst, sondern auch in zentimeterweitem Abstand von ihr. Der Keimungsvorgang ließ sich im letzten Falle ohne Schwierigkeit verfolgen, und die keimenden Sporen konnten durch den Boden der Petri-Schale mikrophotographiert werden. [Auf diese Weise aufgenommene Mikrophotographien vermögen leider in der Regel keinen höheren Schärfegrad zu erreichen, wie aus Abb. 3—5 (S. 278 und 279) hervorgeht.]

Durch die zuletzt erwähnten Beobachtungen und Experimente war also ein zwar eigenartiges, jedoch — wie sich zeigen sollte — fruchttragendes Verfahren entdeckt worden, um Sporenkeimung bei gewissen *Lycoperdon*-Arten zu erzielen. Wie aus dem Folgenden hervorgehen wird, ließ sich dies in kurzer Zeit zu einer vollkommen sicheren und reproduzierbaren Methodik gestalten.

### Die Sporenkeimung bei *Lycoperdon umbrinum Pers.*

Bei den nun folgenden, eingehenderen Versuchen zwecks Erforschung der Art der günstigen Einwirkung gewisser Pilze auf die Sporenkeimung bei *Lycoperdon* beschränkte ich mich darauf, nur mit einer *Lycoperdon*-Art, nämlich *L. umbrinum Pers.*, zu arbeiten, um dann eventuell die hierbei gewonnenen Ergebnisse auch auf andere Arten anzuwenden. Das dabei verwendete Sporenmaterial stammte ausschließlich von einem einzigen Fruchtkörper, der am 23. September 1939 in Femsjö, Småland, durch Herrn Seth Lundell aufgefunden worden war. Dieser Fruchtkörper hatte sich nämlich zum Unterschied von so gut wie allen andern hier geprüften Fruchtkörpern von Anfang an als beinahe völlig infektionsfrei erwiesen, und seine Sporen besaßen einen relativ hohen Keimprozentsatz (etwa 3%).

Als aktivierender Organismus bei diesen Versuchen wurde anfangs selbstverständlich „*Hefe X*“ verwendet.

Das im Vorhergehenden beschriebene Verfahren, das zum ersten geglückten Keimungsversuch mit *Lycoperdon*-Sporen führte, konnte sehr bald beträchtlich vereinfacht werden. Die ganze einleitende Behandlung mit abwechselnd Anfeuchten und Trocknen der Sporen erwies sich für die Erreichung positiver Ergebnisse als vollkommen überflüssig. Durch diese Vereinfachung wurde auch in einer bestimmten Hinsicht ein großer Vorteil erzielt. Die in vielen Fällen bereits von Anfang an bedeutende Infektion durch Bakterien und fremde Pilzsporen in den hergestellten Sporen-Suspensionen entwickelte sich natürlich weiter, falls die Sporen-Suspensionen eine

längere Zeit bei der verhältnismäßig hohen Temperatur stehengelassen wurden, die im Hinblick auf die Eindunstung erwünscht war. Durch Herstellung der Sporen-Suspensionen unmittelbar vor dem Versuch oder durch deren Aufbewahrung bei niedriger Temperatur wurde die Weiterentwicklung vor allem von Bakterien verhindert.

Nachdem weiterhin eine Reihe kleinerer Vereinfachungen stattgefunden hatte, war ich zu folgender einfacher Methode gelangt, die später bei so gut wie allen Versuchen als Kontrolle angewandt wurde und ausnahmslos positive Ergebnisse lieferte.

Die Sporen-Suspension wurde am einfachsten in dest. Wasser in Kolben mit eingeschliffenem Ppropfen hergestellt, worin die Sporen durch kräftiges



Abb. 1. Keimende Spore von *Lycoperdon umbrinum*. Vergr. 1300.

Schütteln ordentlich aufgeschlämmt werden konnten. In der Regel wurde jeder Petri-Schale 1 ccm Sporen-Suspension zugesetzt und gleichförmig in die Malzagarplatte bei deren Guß eingeschmolzen. Mittels einer Platin-Öse wurde dann *Hefe X* (von einer Röhrchenkultur auf Malzagar) hier und da auf die Oberfläche der Platte geimpft, so daß sich darauf etwa 10 bis 20 Kolonien ausbildeten. (Abb. 2 zeigt die Methode in einem Keimungsversuch mit *Scleroderma aurantium* angewandt, s. unten S. 274.)

Die ersten keimenden Sporen ließen sich im allgemeinen 5 Tage nach dem Gießen der Platte wahrnehmen. Wurde Sporen-Suspension auf die Oberfläche zwischen gut herangewachsene Hefekolonien aufgestrichen, fand die Keimung schneller statt, während des vierten Tages oder in Ausnahmefällen bereits während des dritten.

Beim Verlauf der Keimung war nichts Besonderes zu bemerken. Ohne daß die Spore die Form änderte, wuchs von einem Fleck auf ihrer

Oberfläche eine Keimhyphe aus, die sich mitunter unmittelbar verzweigte (Abb. 1) und mitunter eine beträchtliche Länge erreichte, bevor Verzweigung auftrat.

Keimende Sporen wurden immer zuerst in der Nähe der Hefekolonien beobachtet, waren jedoch sehr bald überall auf der Platte zu finden. Durch Entfernung der Hefe nach einer Zeit des Wachstums auf der Platte dürfte man daher ein für die Keimung von *Lycoperdon*-Sporen verwendbares Substrat erhalten. Angestellte Versuche zeigten, daß dies möglich war und das dabei erhaltene Substrat, hier „Hefemalzagar“ genannt, autoklaviert und in Röhrchen verwahrt werden konnte, ohne daß dessen anregende Eigenschaften auf die Keimung verlorengingen.

Hefemalzagar wurde zweckdienlich auf folgende Weise hergestellt. In großen Petri-Schalen wurden 0,5—1 cm dicke Malzagarplatten gegossen und mit *Hefe X* in Form einer Aufschlämmung geimpft, so daß sich eine Deckschicht von Hefe bildete. Nach 6 Tagen wurde die zu diesem Zeitpunkt ziemlich dicke Hefeschicht abgeschabt, die Oberfläche reingespült sowie die Hefemalzagarplatte in Stücke zerteilt und in einem Kolben in strömendem Dampf geschmolzen. Der Hefemalzagar konnte dann auf Röhrchen überführt und autoklaviert oder durch wiederholtes Kochen sterilisiert werden.

Obwohl die Keimung der *Lycoperdon*-Sporen in der Regel besser auf Malzagar mit lebender *Hefe X* als auf Hefemalzagar stattfand, bot das letztere Substrat doch gewisse Vorteile, vor allem bei der Isolierung von Einspormycel.

Aus den eben geschilderten „Grundversuchen“ geht also hervor, daß *Hefe X* durch ein zeitweises Wachstum auf Malzagar eine Veränderung desselben in der Richtung bewirkt, daß Sporen von *Lycoperdon* auf ihm zu keimen vermögen. Diese Eigenschaft wird auch nach Autoklavierung beibehalten. Welcher Art ist nun diese Veränderung? Bedeutet sie, daß dem Substrat ein das Wachstum anregender Stoff zugeführt wird, oder besteht sie in der Entfernung von bereits anfänglich vorkommenden, hemmenden Stoffen?

Die erste Möglichkeit wurde durch mehrere Versuche geprüft. Allen Bestrebungen, aus Hefemalzagar oder *Hefe X* einen wirksamen Extrakt zu erhalten, blieb indessen der Erfolg versagt. Da sich bei *Hefe X* vermuten ließ, daß sie verschiedene Arten von Wuchsstoffen erzeugt, wurde die Wirkung von Aneurin, Biotin, Lactoflavin, Nikotinsäureamid, Ascorbinsäure und Inosit in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen erprobt, in sämtlichen Fällen jedoch ohne Erfolg.

Auch die oben erwähnte zweite Möglichkeit wurde eingehend behandelt. Es kam mir anfangs ziemlich unwahrscheinlich vor, daß es sich einzig und allein um eine Entfernung von keimungshemmenden Substanzen handeln möchte, da in diesem Falle billigerweise auf einem

der zahlreichen Substrate, die in den Einleitungsversuchen erprobt wurden, ein positives Ergebnis hätte erreicht werden müssen. Es wurden indessen jetzt neue Versuche angestellt, wobei große Sorgfalt darauf verwendet wurde, den Agar vor der Kombinierung mit einer geeigneten synthetischen Nährösung durch eine gründliche Waschung in dest. Wasser von allen löslichen Stoffen zu befreien. Ich erhielt hierbei eine dürftige Keimung auf einem Substrat von folgender Zusammensetzung: Glucose 20 g,  $\text{NH}_4\text{-Tartrat}$  5 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g, NaCl 0,1 g,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g,  $\text{FeCl}_3$  (1 %ige Lösung) 10 Tropfen, Agar-Agar 15 g,  $\text{H}_2\text{O}$  (dest.) 1000 ccm.

Bei der Anwendung von ungewaschenem Agar, aber sonst gleicher Zusammensetzung des Nährbodens, fand keine Keimung statt.

In diesem Falle war es also offensichtlich, daß im Agar ursprünglich vorkommende, in Wasser lösliche Stoffe vollständig die Sporenkeimung verhinderten. Es war nun natürlich von Interesse festzustellen, in welchem Grade die gefundenen „keimungsanregenden Organismen“ auf dieses Verhalten einzuwirken vermochten. *Hefe X* wuchs äußerst schwach auf den fraglichen synthetischen Nährböden (auch nach Zusatz von Aneurin, Biotin und Inositol). Nach einiger Zeit rief sie gleichwohl auf dem Substrat mit ungewaschenem Agar Keimung hervor und konnte außerdem das sonst spärliche Keimen auf dem Substrat mit gewaschenem Agar auffallend steigern. Die Wirkung von „*Inf.-Pilz A*“ war vollständig gleichartig, obwohl sie schneller und kräftiger erfolgte, da dieses Mycel auf den genannten synthetischen Nährmedien gut wächst.

Schließlich unternahm ich auch einen Versuch, „*Inf.-Pilz A*“ auf der oben erwähnten synthetischen Nährösung (ohne Agar) zu züchten und die angewandte Kulturflüssigkeit mit Zusatz von gewaschenem Agar als Substrat für Sporenkeimung zu prüfen. Es zeigte sich, daß die unter diesen Bedingungen auftretende Keimung die schnellste und reichlichste war, die ich überhaupt mit *Lycoperdon umbrinum* erhalten habe. Worauf die günstige Veränderung beruht, die die synthetische Nährösung durch die Einwirkung des genannten Mycels erfährt, ist zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse der oben geschilderten Versuche lassen meiner Ansicht nach kaum mehr als eine Deutung zu. Die Sporen von *Lycoperdon umbrinum* keimen nur in einer Umwelt, die frei von gewissen wasserlöslichen, stark keimungshemmenden Stoffen ist, die u. a. in Agar und Malzextrakt vorkommen. Die fraglichen Stoffe können durch Waschung aus dem Agar entfernt, jedoch auch durch die Tätigkeit gewisser Organismen eliminiert oder neutralisiert werden. Diese Organismen scheinen ferner eine weitere Veränderung des Substrats in einer für die Keimung günstigen Richtung zu bewirken, eine Veränderung, deren Natur aber noch nicht näher analysiert ist.

## Die Sporenkeimung bei anderen *Gasteromyceten*.

### a) *Lycoperdon*-Arten.

Unter Anwendung der oben auf S. 271 beschriebenen Methode mit Malzagar + lebender *Hefe X* wurde die Keimfähigkeit bei Sporen von weiteren vier *Lycoperdon*-Arten geprüft, nämlich *L. echinatum* Pers. (von Uppsala, eingesammelt im Oktober 1939), *L. nigrescens* Pers. (von Femsjö, eingesammelt im September 1939), *L. pratense* Pers. (von Femsjö, eingesammelt im September 1939, und von Uppsala, eingesammelt im September 1940) und *L. pyriforme* Pers. (von Uppsala, eingesammelt im September 1940). In sämtlichen Fällen keimten die Sporen, obwohl die Keimprozente äußerst niedrig lagen und mit Sicherheit niemals größer als 0,1% waren. Die Keimungen begannen schon während der ersten Woche des Versuches und verliefen — soweit ich finden konnte — auf gleiche Weise wie bei *Lycoperdon umbrinum*.

Die folgenden Ziffern bezeichnen das Alter der Sporen in Monaten (vom Einsammeln der Fruchtkörper an gerechnet) für die verschiedenen *Lycoperdon*-Arten in den unternommenen Versuchen: *L. umbrinum*: 9—22, *L. echinatum*: 9, 12 und 21, *L. nigrescens*: 13, *L. pratense*: 10 und 12, *L. pyriforme*: 1 und 10. In den Fällen, wo zwei oder mehrere Versuche unter Anwendung von Sporenmaterial von demselben Fruchtkörper veranstaltet wurden, konnte niemals ein Verschwinden oder überhaupt Abnehmen der Keimfähigkeit festgestellt werden. Aus den oben angeführten Ziffern können also keine Schlußfolgerungen hinsichtlich der *Maximalzeit* gezogen werden, während der die *Lycoperdon*-Sporen ihre Keimfähigkeit bewahren.

### b) *Scleroderma aurantium* Pers.

Das Sporenmaterial für die mit *Scleroderma aurantium* durchgeführten Keimungsversuche stammte ausschließlich von ein und demselben Fruchtkörper, der am 14. September 1940 bei Ljungby, Småland, von Dr. O. Modess aufgefunden worden war. Das Innere des Fruchtkörpers erwies sich als vollkommen frei von Infektion durch Bakterien und fremde Pilzsporen.

Der erste Keimungsversuch, bei dem Malzagar mit lebender *Hefe X* als Substrat verwendet wurde, gab ein völlig negatives Ergebnis. Ich erprobte daher ein anderes Substrat, im folgenden als „Hagem-Malzagar“ bezeichnet, das sich als sehr geeignet für die Züchtung von Gewebekulturen von verschiedenen *Basidiomyceten* erwiesen hat (nach Erfahrungen von Dr. O. Modess). Dies hatte folgende Zusammensetzung (Hagems Nährlösung + 0,5% Malzextrakt + 1,5% Agar): Glucose 5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g,  $KH_2PO_4$  0,5 g,  $NH_4Cl$  0,5 g,  $FeCl_3$  (1%ige

Lösung) 10 Tropfen, Malzextrakt 5 g, Agar-Agar 15 g,  $H_2O$  (dest.) 1000 cem. In Platten dieses Nährmediums wurden die Sporen auf gewöhnliche Weise eingeschmolzen, worauf *Hefe X* auf die Oberfläche geimpft wurde. Nach ein paar Wochen konnte ich feststellen, daß einzelne Sporen gekeimt hatten (Abb. 2).

Der Versuch wurde zweimal wiederholt, und hierbei kamen gewöhnliches Malzagar (mit und ohne lebende *Hefe X*), Hefemalzagar sowie

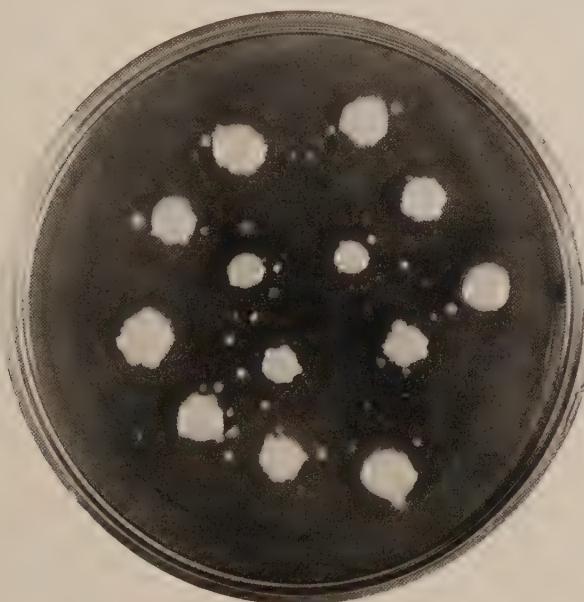


Abb. 2. Zwei Monate alte Platte von einem Keimungsversuch mit *Scleroderma aurantium*. Substrat: Hagem-Malzagar + lebende *Hefe X*. Zwischen den größeren Hefekolonien sieht man kleine Einsporomyzellen von *Scleroderma* heranwachsen. Etwas verkleinert.

Hagem-Malzagar (mit und ohne lebende *Hefe X*) als Substrat zur Erprobung. Keimung fand nur auf Hagem-Malzagar mit lebender *Hefe X* statt.

In dem zuletzt ausgeführten Versuch waren die Sporen 7 Monate alt (vom Einsammeln des Fruchtkörpers an gerechnet), doch war das Keimprozent mindestens ebenso groß wie im ersten geglückten Versuch, wo die Anzahl der keimenden Sporen auf ungefähr 1 % geschätzt wurde. Die ersten Keimungen traten bereits nach einigen Tagen auf, und dann folgten nach und nach neue über einen Monat lang.

Der Verlauf der Keimung wurde nicht näher untersucht. Es entstand jedoch nicht der Eindruck, als ob die großen dickwandigen Sporen eine sichtliche Veränderung bei der Keimung erfuhren.

### Die Sporenkeimung bei *Tricholoma* und *Boletus*.

Die für die Keimung von *Lycoperdon*-Sporen zuerst angewandte Methodik mit lebender *Hefe X* und mit Hefemalzagar wurde während des Sommers 1940 ausgearbeitet. Ich beschloß daher, während des Herbstes mit seinem Vorkommen an fleischigen Hutpilzen die Anwendung der genannten Verfahrungsweisen auch bei einer Reihe mykorrhizabildender *Hymenomyceten* von den Gattungen *Tricholoma* und *Boletus* zu versuchen.

Die Sporen der zu untersuchenden Arten wurden in sterilen Petri-Schalen aufgefangen und verwahrt. Die Bereitung der Aufschlämmlungen fand in Jenaer Glaskolben mit sterilem dest. Wasser statt. Beim Gießen der Versuchsplatten wurde in der Regel 1 ccm Sporen-Suspension in jede Petri-Schale gebracht, worauf das zu erprobende Substrat in geschmolzenem Zustand bei einer Temperatur von + 42° eingegossen wurde. Hierdurch kam eine ziemlich gleichmäßige Verteilung der Sporen in der Platte zustande. Außerdem wurde häufig mittels Platin-Öse Sporen-Suspension auf die Oberfläche des Substrats aufgestrichen, sobald dies erstarrt war. Die Schalen wurden unter Glasglocken bei + 25° aufgestellt.

Die Fruchtkörper, die das Sporenmaterial für die Versuche lieferten, waren von mir in den Nadelwäldern um Uppsala im Herbst 1940 ein-

Tabelle I. Übersicht über die Keimungsversuche mit Sporen von *Tricholoma*- und *Boletus*-Arten.

Angewandte Nährböden. I: Malzagar + lebende *Hefe X*; II: Hagem-Malzagar + lebende *Hefe X*; III: Hefemalzagar; IV: Malzgelatine.

Versuchsstoff	Datum (1940)		Alter der Sporen in Tagen		Substrat und Keimung	
	für das Abwerfen der Sporen	für das Eingießen der Sporen	a *	b **	Keimung erfolgte auf	keine Keimung auf
<i>Tr. pessundatum</i>	30. IX.	30. IX.	1		I	—
	21. X.	21. X.	1		I, (II), III	—
	21. X.	31. X.	10		(I), III	—
	21. X.	31. X.		10	I, III	—
	21. X.	21. XI.	30		—	III
	21. X.	21. XI.		30	III	—
<i>Tr. terreum</i> ....	16. IX.	21. IX.	5		I	II
	29. IX.	3. X.	4		I	—
	21. X.	22. X.	1		III	—
<i>Tr. imbricatum</i>	27. X.	30. X.	3		I, III	—
<i>Bol. luteus</i> ....	21. X.	21. X.	1		I, (II)	III
	21. X.	31. X.	10		I	III
	21. X.	31. X.		10	I	III
	21. X.	21. XI.	30		—	III
<i>Boletus</i> ....	21. X.	21. XI.		30	III	—
	4. IX.	6. IX.	2		I	II, IV

\* Trocken aufbewahrte Sporen. — \*\* In Wasser aufbewahrte Sporen.

gesammelt worden. *Tricholoma album* (Schaeff.) Fr., *T. saponaceum* Fr., *T. vaccinum* (Pers.) Fr., *Boletus badius* Fr., *B. elegans* Fr., *B. variegatus* (Sw.) Fr. und *B. subtomentosus* (L.) Fr. konnten nicht zum Keimen gebracht werden, während hingegen positive Ergebnisse, die im folgenden eingehender behandelt sind, mit *Tricholoma pessundatum* Fr., *T. terreum* (Schaeff.) Fr., *T. imbricatum* Fr., *Boletus luteus* (L.) Fr. und *B. granulatus* (L.) Fr. erreicht wurden.

In Tabelle I wird eine Übersicht der Keimungsversuche gegeben, die mit Sporen von den letztgenannten *Tricholoma*- und *Boletus*-Arten ausgeführt wurden.

a) *Tricholoma pessundatum* Fr.

Mit dieser Art wurden mehrere geglückte Keimungsversuche unternommen, wobei Sporen von zwei verschiedenen Fruchtkörpern geprüft wurden. Auf gewöhnlichem Malzagar fand keine Keimung statt, wofern nicht die Platte mit lebender *Hefe X* geimpft wurde. Hagem-Malzagar + lebende *Hefe X* erwies sich als schlechteres Substrat, wohingegen mit Hefemalzagar ein besseres Ergebnis erzielt wurde.

Bei gewissen Versuchen wurde die Keimfähigkeit etwas älterer Sporen geprüft, die sich entweder die ganze Zeit über aufgeschlämmt in steriles dest. Wasser befanden oder trocken in sterilen Petri-Schalen bei einer Temperatur von 15° lagen. Nach einer zehntägigen Verwahrung war die Keimung der Sporen in beiden Fällen gut, nach 30 Tagen jedoch nur bei denen, die während dieser Zeit in Wasser gelegen hatten. Die Keimung war indessen in diesem Falle ungemein dürftig. Es schien also, als ob die Sporen sehr kurzlebig wären und, falls sie nicht feucht gehalten werden, bereits innerhalb eines Monats ihre Keimfähigkeit verloren.

Gutes Keimen, z. B. auf Hefemalzagar, findet schon nach ein paar Tagen statt, und das aus sehr gerade wachsenden Hyphen bestehende Primärmycel verzweigt sich reich und sternförmig mit der Spore in der Mitte.

b) *Tricholoma terreum* (Schaeff.) Fr.

Obzwar nicht experimentell geprüft ist, ob diese Art einen Mykorrhizabildner darstellt, sprechen doch viele Gründe hinsichtlich ihres Vorkommens dafür, daß dem wirklich der Fall ist. Ich habe mir deshalb erlaubt, sie unter die übrigen hier behandelten, mit Sicherheit festgestellten Mykorrhizapilze mit aufzunehmen. Syntheseversuche mit *Tricholoma terreum* ließen sich bisher nicht durchführen, da es bis jetzt nicht möglich war, den fraglichen Pilz in Reinkultur zu bringen.

Überraschenderweise keimte dieser schwerzüchtbare Pilz bereits während 1—2 Wochen in sämtlichen drei Keimungsversuchen, die mit ihm unternommen wurden. Hierbei kam Sporenmaterial von drei verschiedenen Fruchtkörpern zur Verwendung, und das Alter der

Sporen betrug in den betreffenden Fällen 1, 4 und 5 Tage. Sowohl Malzagar mit lebender Hefe wie Hefemalzagar wurden mit Erfolg geprüft.

Es war indessen offenbar, daß die Keimung unter großen Schwierigkeiten vor sich ging und das Keimprozent sehr niedrig lag. Beim Keimen

schwoll die Spore zu einer großen Blase an, von der allmählich mehrere Hyphen auswuchsen (Abb. 3). Aus unbekanntem Grunde hörte das Wachstum der Hyphen recht bald auf, wonach offensichtlich schnell der Tod eintrat.

c) *Tricholoma imbricatum* Fr.

Mit diesem Pilz wurde nur ein Versuch unternommen, der indessen ein langsames, aber ziemlich allgemeines Keimen sowohl auf Hefemalzagar als auf Malzagar mit lebender Hefe als Ergebnis hatte.

Die Sporen waren zu Beginn des Versuchs 3 Tage alt. Die Keimung erfolgte im großen und ganzen auf die gleiche Weise wie bei *Tricholoma terreum* (Abb. 4).



Abb. 3. Keimende Spore von *Tricholoma terreum*. Vergr. 290.



Abb. 4. Zwei gekeimte Sporen von *Tricholoma imbricatum*. Vergr. 290.

d) *Boletus luteus* (L.) Fr.

Mit *Boletus luteus* wurden drei Keimungsversuche durchgeführt, wobei das gleiche Sporenmaterial zur Anwendung kam, das von einem am 21. Oktober 1940 eingesammelten Fruchtkörper stammte. Beim ersten Versuch wurden völlig frische Sporen verwendet, die bereits während der ersten Woche auf Malzagar mit Kolonien von lebender *Hefe X* keimten, dagegen nicht auf Hefemalzagar. Der zweite Versuch, bei dem 10 Tage alte Sporen geprüft wurden, lieferte das gleiche Ergebnis. Die Sporen, die während dieser Zeit trocken gelegen hatten,



Abb. 5. Keimende Sporen von *Boletus luteus*. Vergr. 360.

keimten jedoch bedeutend schlechter als die die ganze Zeit über in Wasser aufbewahrten. Beim dritten Versuch wurden teils Sporen aus einer 30 Tage alten Sporen-Suspension genommen, teils eine neue Suspension von Sporen hergestellt, die während der gleichen Zeit trocken in einer Petri-Schale gelegen hatten. Infolge eines bedauerlichen Mißgeschicks wurden die Reihen mit lebender *Hefe X* zerstört, während die Reihen mit Hefemalzagar planmäßig zur Durchführung kamen. Überraschenderweise und im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen mit *Boletus luteus* fand diesmal eine — wenn auch spärliche — Keimung auf Hefemalzagar statt, was aller Wahrscheinlichkeit nach den unabwendbar schwankenden Eigenschaften dieses Substrats zugeschrieben werden kann. Es keimten jedoch nur die 30 Tage lang in Wasser aufbewahrten Sporen, worin das Versuchsergebnis also mit *Tridem* übereinstimmt, das unter genau gleichen Bedingungen mit *Tri-*

*choloma pessundatum* erhalten wurde. Es scheint also, als ob auch die Sporen von *Boletus luteus* ungemein empfindlich für Austrocknung wären.

In den Platten, und zwar da, wo die Keimung am besten vor sich ging, dürften ungefähr 2–3 % der im Substrat befindlichen Sporen gekeimt haben. Zum Unterschied gegenüber den *Tricholoma*-Arten erlitten die Sporen hier bei der Keimung niemals eine größere Veränderung, sondern bewahrten ihre längliche Form, abgesehen von einer gewissen Anschwellung, wo die kräftige Keimhyphe auslief. Diese wuchs gewöhnlich von der Längsseite der Spore aus, und mitunter konnte eine „Keimblase“ ganz in der Nähe der Spore selbst entstehen (Abb. 5).

Das Primärmycel verzweigte sich nie so ausgesprochen strahlenförmig wie bei *Tricholoma*, sondern die Hyphen wuchsen anfangs recht regellos hierher und dahin. Es war übrigens offensichtlich, daß das Mycel sehr langsam und schlecht (Blasenbildung auf den Hyphen!) auf den durch *Hefe X* beeinflußten Substraten wuchs, obwohl nur diese die Sporenkeimung zu induzieren vermochten. Wurden die jungen Einspormycelien auf — für Keimung völlig unanwendbaren — gewöhnlichen Malzagar überführt, begann sofort ein bedeutend schnelleres und besseres Wachstum. Dieses Verhalten zeigt deutlich, wie verschiedene Faktoren oder Faktorenkomplexe Sporenkeimung und Hyphenwachstum bedingen.

#### e) *Boletus granulatus* (L.) Fr.

Bei dem einzigen geglückten Keimungsversuch, der mit *Boletus granulatus* stattfand, wurde nur die Wirkung von lebender *Hefe X* auf in Malzagar, Hagem-Malzagar und Malzgelatine eingegossene Sporen geprüft. Nur beim ersten Substrat fand Keimung statt.

Bezüglich des Verlaufs der Keimung stimmt *Boletus granulatus*, soweit ich finden konnte, völlig mit *Boletus luteus* überein.

#### Besprechung der Ergebnisse.

Obwohl die bisher erreichten, hier beschriebenen Ergebnisse zum großen Teil als vorläufig angesehen werden müssen, bieten sie doch die Möglichkeit zu gewissen Betrachtungen und erlauben eine Reihe allgemeiner Schlußfolgerungen zu ziehen.

Wie sich erstens feststellen läßt, zeigten die durchgeföhrten Versuche, daß Sporen von *Lycoperdon*- und *Boletus*-Arten wirklich keimfähig sind, was — trotz des augenscheinlich Absurden einer derartigen Möglichkeit — nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden durfte. Die Keimprozente hielten sich jedoch für beide genannten Gattungen auch bei den am besten geglückten Versuchen durchweg bei sehr niedrigen Werten. Dies könnte natürlich ganz einfach darauf beruhen, daß die

Bedingungen, unter denen die Keimung stattfand, nicht im entfernten optimal waren. Wenigstens bezüglich *Lycoperdon umbrinum*, mit dem die größte Zahl Versuche unternommen wurde, scheint es sich doch tatsächlich so zu verhalten, daß nur ein geringer Prozentsatz sämtlicher gebildeter Sporen keimfähig ist. Bei den letzten Versuchen mit dieser Art war es nämlich offenbar, daß wenn nicht optimale, so doch sehr gute Keimungsbedingungen wirklich geschaffen worden waren, da bei der Hauptmenge der tatsächlich keimenden Sporen die Keimung auch ziemlich schnell erfolgte (4—7 Tage nach der Placierung im Substrat). Die theoretisch denkbare Möglichkeit, daß die restlichen ungekeimten Sporen wesentlich abweichende Bedingungen für ihre Keimung fordern würden, dürfte als äußerst unwahrscheinlich zu betrachten sein. Andere Fälle, in denen man normalerweise sehr niedrige Keimprozente annehmen muß, wurden übrigens bereits früher entdeckt, z. B. *Fomes applanatus* (White 1920).

Auch wenn — wie man ja vermuten muß — die Basidiosporen für *Lycoperdon* das einzige wesentliche Mittel zur Verbreitung und in gewissem Grade auch zum Bestand der Art darstellen, bleibt gleichwohl auch bei sehr niedrigen Keimprozenten die Zahl der keimfähigen Sporen bei diesen ungeheuer produktiven Fruchtkörpern sehr groß.

Bezüglich der Zeit, während der die Sporen ihre Keimfähigkeit bewahren, verhalten sich die hier untersuchten Pilze wesentlich verschieden. Sporen von *Tricholoma*- und *Boletus*-Arten scheinen, falls man einige Schlußfolgerungen aus den sehr wenigen in dieser Hinsicht geschehenen Beobachtungen ziehen will, bereits nach einer einmonatlichen Verwahrung in Trockenheit ihre Keimfähigkeit verloren zu haben. Wie man mit Recht erwartete, verhalten sich die *Gasteromyceten* völlig anders. Die Sporen von *Scleroderma* keimten sowohl 1 als 7 Monate nach dem Einsammeln des Fruchtkörpers. Von *Lycoperdon pratense* wurden keimende Sporen 12 Monate nach dem Auffinden des Fruchtkörpers erhalten, bei *L. echinatum* und *L. nigrescens* nach 21 bzw. 13 Monaten. Die am besten untersuchte Art, *L. umbrinum*, zeigte — soweit ich finden konnte — die gleiche Keimfähigkeit nach 9 wie nach 22 Monaten.

Die Versuche, die Bedingungen der Sporenkeimung eingehender klarzustellen, befinden sich im Hinblick auf die offensichtlich komplizierte Natur des Problems noch in einem vorbereitenden Stadium. Soviel hat sich indessen schon klar ergeben, daß die alte, vielleicht vor allem von *Brefeld* (1908) verfochtene Auffassung von einer langen Reifezeit für diese schwerkeimenden Sporen durch meine Erfahrungen keine Stütze erhalten hat. Gemäß der älteren Auffassung ging es vor allem darum, die Sporen auf richtige Weise während eines als ziemlich lang vermuteten Zeitabschnitts aufzubewahren, worauf diese nach

Abschluß des inneren Reifevorganges zur Keimung imstande sein sollten. Sporen von *Tricholoma*- und *Boletus*-Arten vermögen indessen bereits wenige Tage nach dem Wegschleudern von den Basidien zu keimen, weshalb die Reifezeit, falls man hier eine solche annehmen will, äußerst kurz sein muß. Das gleiche gilt vermutlich auch für *Lycoperdon* und *Scleroderma*, obschon es in diesen Fällen nicht möglich ist, das Alter der Sporen genau festzustellen. Kommt hier eine Reifezeit vor, so kann sich diese wahrscheinlich auf höchstens einen oder einige wenige Monate belaufen.

Es scheint so, als ob nach den bisher unternommenen Versuchen die Sporen von sowohl *Gasteromyceten* als mykorrhizabildenden *Hymenomyceten* sich durch große Empfindlichkeit keimungshemmenden Stoffen gegenüber auszeichnen. Es handelt sich also darum, entweder von Anfang an durch äußerste Sauberkeit und Sorgfalt das Substrat von derartigen Stoffen freizuhalten — wobei man jedoch leicht Gefahr läuft, gleichzeitig auch wichtige oder notwendige Stoffe auszuschalten — oder durch einen geeigneten fremden Organismus das Substrat von den hemmenden Stoffen befreien zu lassen. Die letztgenannte Methode kann bequem sein, ist aber natürlich ziemlich stark Zufällen unterworfen und schwer kontrollierbar, wodurch sie sicherlich einen beschwerlicheren Ausgangspunkt für fortgesetzte Untersuchungen bildet.

Schließlich sei an die Möglichkeit erinnert, für die sich vielleicht eine Stütze in gewissen angestellten Beobachtungen ergibt, nämlich daß eine Reihe der hier untersuchten Pilze wenigstens für optimale Keimung das Vorhandensein eines gewissen, direkt die Keimung angregenden Stoffes im Substrat verlangen.

### Zusammenfassung.

1. Sporen von *Gasteromyceten* (mit Ausnahme von *Sphaerobolus* und *Nidulariaceen*) und mykorrhizabildenden *Hymenomyceten* sind früher mit Sicherheit nicht zum Keimen gebracht worden. Die vorliegende Arbeit bezweckte, die Hervorrufung von Sporenkeimung bei einigen zu diesen Gruppen gehörenden Pilzen zu versuchen, und zwar bei Arten der Gattungen *Lycoperdon* und *Scleroderma* (*Gasteromyceten*) sowie *Boletus* und *Tricholoma* (*Hymenomyceten*). Folgende, teilweise vorläufigen Ergebnisse wurden erzielt:

2. Sporen von *Lycoperdon umbrinum* Pers. keimten auf Malzagar in Anwesenheit gewisser Hefepilze (z. B. *Torula Suganii* *Okunuki*, *Torulopsis sanguinea* (*Scimon*) *Cif.* et *Red.* und einer wilden „*Hefe X*“) oder von hyphenbildenden Pilzen (z. B. *Trichosporium heteromorphum* *Nannf.*, *Cladosporium* sp. und „*Inf.-Pilz A*“), die jedoch eine bedeutend schwächere keimungserzeugende Wirkung aufwiesen als jene. Unter Beihilfe der genannten *Hefe X* wurde Keimung auch bei Sporen von

*Lycoperdon echinatum* Pers., *L. nigrescens* Pers., *L. pratense* Pers., *L. pyriforme* Pers., *Scleroderma aurantium* Pers., *Tricholoma imbricatum* Fr., *T. pessundatum* Fr., *T. terreum* (Schaeff.) Fr., *Boletus granulatus* (L.) Fr. und *B. luteus* (L.) Fr. auf Malzagar oder (*Scleroderma*) auf sog. Hagem-Malzagar induziert. Ohne Mitwirkung eines solchen „keimungsanregenden Organismus“ wurde keine Keimung auf den erwähnten Nährböden erhalten.

3. Mit diesen Beobachtungen als Ausgangspunkt wurden eine Reihe von Versuchen unternommen, um die Keimungsbedingungen für einen der erwähnten Pilze, nämlich *Lycoperdon umbrinum* Pers., näher klarzulegen. Die Ergebnisse dieser allerdings vorläufigen und nicht voll gesicherten Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die Sporen von *L. umbrinum* keimen nur in einer Umwelt, die frei von gewissen wasserlöslichen, stark keimungshemmenden Stoffen ist, die u. a. in Agar und Malzextrakt vorkommen. Die fraglichen Stoffe können aus dem Agar durch Waschen entfernt werden, lassen sich jedoch auch durch die Tätigkeit gewisser Organismen eliminieren oder neutralisieren. Diese Organismen bewirken anscheinend außerdem eine weitere Veränderung des Substrates in einer für die Keimung günstigen Richtung. Indessen ist die Natur dieser Veränderung noch nicht näher analysiert.

4. Die Sporen von *Lycoperdon* und *Scleroderma* bewahren in trockenem Zustand lange ihre Keimfähigkeit: *Lyc. umbrinum* während wenigstens 22 Monaten, *Scl. aurantium* während mindestens 7 Monaten. Dagegen scheint es, als ob die Sporen von *Boletus* und *Tricholoma* bedeutend kurzebiger wären; sichere Bestimmungen wurden jedoch nicht durchgeführt.

5. Es deuten keine Umstände darauf hin, daß die Sporen von einem der hier untersuchten Pilze zuerst eine längere Reifeperiode durchmachen müssen, bevor die Keimung stattfinden kann. Sporen von *Boletus*- und *Tricholoma*-Arten vermögen jedenfalls schon wenige Tage nach dem Verlassen der Basidien zu keimen.

### Literatur.

*A. de Bary*, Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Leipzig 1866. — *Derselbe*, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Myctozoen und Bacterien. Leipzig 1884. — *E. Bechmann*, Zeitschr. f. Bot. 22, 289, 1929. — *I. H. Blank u. W. N. Tiffney*, Mycologia 28, 324, 1936. — *O. Brefeld*, Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie 3, 1877; 14, 1908. — *E. Bruns*, Flora 78, 67, 1894.

*C. Cool*, Mededeel. uit het Phytopatholog. Laborat. „Willie Commelin Scholten“ 3, 1912. — *A. C. J. Corda*, Anleitung zum Studium der Mycologie nebst kritischer Beschreibung aller bekannter Gattungen, 1842.

*E. Eidam*, Beitr. z. Biol. Pfl. **2**, 221, 1877. — *H. v. Euler*, Biochem. Zeitschr. **165**, 23, 1925.

*M. C. Ferguson*, U. S. Dept. Agric. Bull. **16**, 1902. — *E. Fischer*, Bot. Ztg. **42**, 433, 1884.

*F. A. Gilbert*, Amer. J. Bot. **16**, 280, 1929.

*C. Hammarlund*, Bot. Notiser (1923), 305, 1923. — *R. Hesse*, Jahrb. f. wiss. Bot. **10**, 199, 1876. — *H. Hoffmann*, Bot. Ztg. **17**, 209, 1859. — *Derselbe*, Jahrb. f. wiss. Bot. **2**, 267, 1860.

*E. Jahn*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **23**, 489, 1905.

*F. H. O. Kaufmann*, Bot. Gaz. **96**, 282, 1934.

*H. Leininger*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **33**, 288, 1915. — *M. Levine*, Bull. Torrey Bot. Club **40**, 137, 1913. — *F. Lorenz*, Arch. f. Protistenk. **81**, 361, 1933.

*E. Melin*, Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. Handb. biol. Arbeitsmeth., Abt. XI, Teil 4, 1015, 1936.

*T. P. Pillay*, Jahrb. d. phil. Fakultät II. der Universität Bern **3**, 197, 1923. — *A. Pitra*, Bot. Ztg. **28**, 681, 1870.

*D. Swartz*, Pap. Mich. Acad. Sci. **9**, 299, 1928.

*R. Vandendries*, Bull. Soc. Mycol. France **49**, 130, 1933.

*J. H. White*, Trans. Roy. Canad. Inst. **12**, 133, 1920.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

## Über Eiweißbildung durch Bakterien.

V. Mitteilung:

Kohlenstoff- und Stickstoffquellen für *Bacillus glycinophilus*.

Von

August Rippel, Kurt Nabel und Werner Köhler.

(Eingegangen am 8. September 1941.)

In Fortsetzung unserer Versuche (A. Rippel; A. Rippel, G. Behr u. K. Nabel; A. Rippel u. K. Nabel) über die Eiweißbildung durch *Bacillus glycinophilus* haben wir die Eignung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen untersucht. Wenn auch auf diesem Gebiete bei anderen Bakterien schon zahlreiche Feststellungen vorliegen, so dürfte doch die Eigenart unseres Organismus, die aus den folgenden Darlegungen hervorgehen wird, und die Seltenheit einer quantitativen Durchführung der Versuche diese Ausführungen rechtfertigen.

Da bei allen Versuchen der früher als so nützlich erkannte Zusatz von 0,1 % Agar zur Nährösung verwendet wurde, so sei zunächst angeführt, daß in einer lediglich 0,1 % Agar als Kohlenstoffquelle enthaltenden, hinsichtlich der Mineralstoffe vollständigen Nährösung bei Ammoniumsulfat, entsprechend 0,1 % Glykokoll, als Stickstoffquelle nach 2 Tagen 0,14, nach 4 Tagen 0,28 mg Eiweiß-Stickstoff festgestellt wurden. Diese Menge in 50 ccm Nährösung, die etwa 1,5 bis 2,0 % des Agar-Kohlenstoffs entspricht, kann demnach bei den folgenden Betrachtungen als zu gering vernachlässigt werden.

### Kohlenstoffquellen.

Tabelle I zeigt das Ergebnis zweier Versuche mit verschiedenen Zuckern, mit Mannit und Äthylalkohol als Kohlenstoffquellen. Von den Hexosen wird somit nur die Glucose gut verwertet, die übrigen drei schlecht. Von den Zahlen müssen dabei noch die oben erwähnten 0,28 mg aus dem Agar abgezogen werden, ferner ein etwa 1 bis 1,5 mg Eiweiß-N betragender Wert für die Verwertung des als Stickstoffquelle zugesetzten Kohlenstoff des Glykokolls, so daß die Verarbeitung z. B. von Mannose mit 2,59 mg Eiweißstickstoff nach 6 Tagen Kulturdauer recht gering erscheint. Ebenso schlecht werden die beiden Pentosen verwertet, Lactose um ein geringes besser, Äthylalkohol einigermaßen, wenn man berücksichtigt, daß durch Verdunstung eine gewisse Menge davon verloren gehen dürfte. Glucose, Rohrzucker, Mannit und Glycerin werden in der Endwirkung gleich gut verwertet, Mannit offenbar von Beginn an am besten. Die Verschieden-

Tabelle I. Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen durch *Bacillus glycophilus*.

Kohlenstoffquelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen			Kohlenstoffquelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		
	2	4	6		2	4	6
Versuch 1.				Versuch 2.			
Glucose .....	4,61	15,77	16,42	Glucose .....	1,73	10,81	15,62
Glycerin .....	3,95	15,34	16,35	Rohrzucker ..	2,52	10,88	15,99
Mannit .....	6,50	16,20	16,42	Mannose .....	1,44	2,52	2,59
Rohrzucker ..	4,47	13,40	16,63	Lävulose .....	0,93	3,03	3,53
Maltose .....	4,89	16,06	16,70	Galaktose ...	1,15	3,39	3,17
Lactose .....	3,32	4,18	3,81	Xylose .....	0,86	2,52	2,73
Äthylalkohol .	2,74	5,54	5,98	Arabinose ...	1,30	2,52	2,37

Nährlösung: Kohlenstoffquelle 1,0 %, Glykokoll 0,2 %,  $MgSO_4$  0,01 %,  $FeSO_4$  5 mg %,  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  = 0,4/0,2 %<sup>1</sup>, Agar 0,1 %, dest. Wasser; 50 ccm in 250er Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer 20er Glas, Thermostat bei 37°.  $pH$  = 6,3. Mittel aus je 2 Parallelen.

heit in der Höhe der Eiweißausbeute bei beiden Versuchen nach 2 und 4 Tagen röhrt von dem verschieden schnellen Wachstum der zu verschiedener Zeit angesetzten Versuche, eine Erscheinung, die sich immer wieder einmal zeigt. Sie hat auf das Ergebnis grundsätzlich keinen Einfluß, zeigt aber, wie notwendig es ist, sich nicht auf einen einzigen Versuch mit nur einer Ernte zu Vergleichszwecken zu verlassen.

Auffallend erscheint jedenfalls die schlechte Wirkung von Lävulose und Mannose. Mit diesen beiden Zuckern haben wir daher, unter Vergleich mit Glucose, den in Tabelle II wiedergegebenen Versuch durch-

Tabelle II. Wirkung verschiedener Zuckerkonzentration auf *B. glycophilus*.

Kohlenstoffquelle	In %	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		
		2	4	6
Glucose .....	0,25	4,18	4,75	7,65
	0,50	2,74	11,66	11,66
	1,0	3,37	11,45	15,41
Lävulose .....	0,25	3,35	4,32	4,39
	0,50	1,66	3,60	4,82
	1,0	1,88	3,74	4,61
Mannose .....	0,25	2,59	3,39	3,31
	0,50	2,88	2,81	3,24
	1,0	1,47	3,39	3,46

Nährlösung usw. wie in Tabelle I.

<sup>1</sup> Wir benutzen die Gelegenheit, darauf hinzuweisen, daß bei Versuch Tabelle I, S. 359 unserer früheren Arbeit (A. Rippel u. K. Nabel, 1939) die Angaben für die beiden Phosphate vertauscht sind, was ja auch aus den  $pH$ -Werten hervorgeht.

Tabelle III. Wirkung höherer Zuckerkonzentration bei Glykokoll und Ammoniumphosphat als N-Quellen auf *B. glycophilus*.

C-Quelle	N-Quelle	mg Eiweiß-N nach Tagen		Nach 4 Tagen bei $pH$ 6,2
		2	4	
Glucose 1 %	Glykokoll	17,52	18,36	9,36
	Ammoniumphosphat	2,80	13,46	
	Glykokoll	12,96	17,86	
	Ammoniumphosphat	4,08	11,38	
Lävulose 1 %	Glykokoll	5,97	6,55	6,6
	Ammoniumphosphat	2,30	3,74	
	Glykokoll	3,53	3,55	
	Ammoniumphosphat	2,47	2,23	

Nährlösung 0,2 % Glykokoll bzw. entsprechend  $(NH_4)_2PO_4$ .  $pH$  6,6.  
Sonst wie üblich.

geführt, bei Variierung der Zuckerkonzentration. Er zeigt, daß sich bei geringerer Konzentration der Lävulose (0,25 %) die Werte nach 2 und 4 Tagen denen der Glucose nähern, während bei 0,5 und 1,0 % nach 2 Tagen die Hemmung deutlich ist. Später holen diese Gaben auf und erreichen den gleichen Endwert wie bei 0,25 %, bleiben aber weit hinter den Glucosewerten zurück. Mannose verhält sich ähnlich, nur liegen die Werte, wie in Tabelle I noch etwas unter denen der Lävulose. Insbesondere die Wirkung der Lävulose ist schwer zu verstehen. Doch zeigten Versuche, von denen einer in Tabelle III wiedergegeben ist, daß die Verwertung der Lävulose bei Ammoniumphosphat noch schlechter ist als bei Glykokoll als N-Quelle. Das deutet darauf hin, daß die Verwertbarkeit der beiden Kohlenstoffquellen nicht durch eine Wechselwirkung mit dem Stickstoffumsatz zustande kommt, im Falle des Glykokolls also die schlechtere Wirkung der Lävulose im Vergleich zur Glucose nicht durch eine stärkere Ablenkung von der Desaminierung durch die Lävulose zu erklären ist. Wir glauben daher auch, daß unser früherer Schluß (*A. Rippel u. K. Nabel*, S. 373f.), wonach sich bei höherer Glucosekonzentration eine stärkere Hemmung des Wachstums ergibt bei Glykokoll als N-Quelle im Vergleich zu Ammoniumphosphat als N-Quelle nicht mehr zu Recht besteht. Wahrscheinlich war das Ergebnis dadurch vorgetäuscht, daß der  $pH$ -Wert bei Ammoniumphosphat ein wenig höher war (6,5) als bei Glykokoll (6,2) (Tabelle VIII, S. 371 bei *A. Rippel u. K. Nabel*). Ein in dieser Richtung unternommener Versuch bestätigte diese Auffassung: In Tabelle III ist rechts noch der bei  $pH$  6,2 für 3 % Glucose erhaltene Wert angegeben, der, wie man sieht, niedriger ist als der entsprechende für Ammoniumphosphat bei  $pH$  6,6 gefundene (9,36 gegen 11,38 mg Eiweiß-N).

Daß Glucose und Lävulose verschieden gut verwertet werden, ist eine häufig beobachtete Erscheinung, wobei zumeist Glucose die bessere

Kohlenstoffquelle ist. Von *Nektarhefen* wird jedoch vereinzelt nach Zinkernagel Lävulose besser verwertet. Namentlich bei *Essigbakterien* wird vielfach Lävulose nicht angegriffen, im Falle von *B. acetigenoideum* erfolgt aus ihr nach *Krehan* zwar keine Säuerung, aber sie kann assimiliert werden. Einige weitere Angaben bringen *Buchanan* u. *Fulmer*, Bd. 3, S. 321f. Es ist nun auffallend, daß unser Bakterium laut Tabelle I Rohrzucker etwa so gut verwertet wie Glucose, also auch die darin befindliche Lävulose, deren Konzentration (1% Rohrzucker) 0,5% betragen würde, eine, wie Tabelle II zeigt, noch schädliche Menge. Da aber nach dieser Tabelle durch 0,5% Glucose 11,66, durch 0,5% Lävulose 4,82 mg Eiweißstickstoff festgelegt werden, so ergibt sich eine Gesamtmenge für 0,5% Glucose + 0,5% Lävulose (= 1% Rohrzucker) von 16,48 mg Eiweiß-N, mithin die in Tabelle I durch 1% Rohrzucker erzielte Menge. Man ist demnach nicht genötigt, etwa eine andere

Tabelle IV. Organische Säuren als Kohlenstoffquellen für *B. glycinophilus*.

Kohlenstoffquelle	Stickstoffquelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		
		2 (pH)	4 (pH)	6 (pH)
Na-Aacetat 0,5 %	NH <sub>4</sub> -Acetat 0,146 %	1,80 (7,1)	4,90 (> 9)	5,26 (> 9)
„ 0,354 %	„ 0,292 %	0,93 (7,0)	5,11 (> 9)	5,18 (> 9)
„ 0,208 %	„ 0,438 %	0,51 (6,9)	5,69 (> 9)	5,62 (> 9)
„ 0,062 %	„ 0,584 %	0,36 (6,9)	5,76 (> 9)	5,69 (> 9)
Milchsäure 0,6 %	NH <sub>3</sub> 0,1% Glykokoll	nach 14 Tagen 1,94 (pH 7,2)		
Glyoxylsäure 0,6 %	Dasselbe			kein Wachstum
Glykolsäure 0,6 %	„	„	„	
Oxalsäure 0,6 %	„	„	„	kein Wachstum

Nährlösung usw. wie in Tabelle I, jedoch K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub> / K<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub> = 0,2 / 0,4. Alle Nährlösungen auf pH 6,9 eingestellt.

Tabelle V. Organische Säuren als Kohlenstoffquellen für *B. glycinophilus*.

Kohlenstoffquelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		
	5 (pH)	7 (pH)	24 (pH)
Essigsäure .....	4,25 (8,7)	5,17 (8,8)	
Citronensäure .....	1,80 (7,3)	2,45 (8,1)	
Bernsteinsäure .....	1,37 (7,4)	2,44 (8,3)	3,39 (8,3)
Äpfelsäure .....	kein Wachstum		
Weinsäure .....	kein Wachstum		
Buttersäure .....			
Ameisensäure .....	kein Wachstum		

Nährlösung usw. wie in Tabelle IV. Alle Säuren wurden 0,6%ig gegeben und das pH der Nährlösung mit Natronlauge auf 6,85 gebracht. Stickstoff als Ammoniaksalz der betreffenden Säure, entsprechend 0,1% Glykokoll.

Verwertung des Rohrzuckers als über die beiden Monosaccharide anzunehmen (etwa durch direkte Verarbeitung des Rohrzuckers).

Tabelle IV und V zeigen Versuche mit einigen organischen Säuren als Kohlenstoffquellen, bei Ammoniaksalz der betreffenden Säure als Stickstoffquelle. Die fertigen Nährösungen wurden mit Natronlauge auf  $p_{\text{H}}$  6,9 bzw. 6,85 gebracht. Man sieht, daß keine der geprüften Säuren an die Wirkung der Essigsäure herankommt. Glyoxyl-, Glykol-, Ameisen-, Oxal-, Butter- und Weinsäure waren ganz unbrauchbar, Citronen-, Bernstein- und Äpfelsäure nur mäßig, Milchsäure nur sehr schlecht zu verwerten. Das ist sicherlich auffallend, da z. B. Milch- und Bernsteinsäure von Bakterien im allgemeinen gut verwertet werden (S. 295). Auch die Essigsäure wurde bei den vorliegenden Versuchen nicht so gut verarbeitet wie die Glucose, da in keinem Fall ein Eiweiß-N-Wert von 7 bis 8 erreicht wird, wie es bei annähernd vollständiger Verarbeitung des Stickstoffs der Fall hätte sein müssen<sup>1</sup>. Das liegt aber offenbar daran, daß aus dem stark alkalisch werdenden Substrat Ammoniak verdunstet, wodurch die weitere Substanzbildung unterdrückt wird, soweit nicht die alkalische Reaktion selbst das weitere Wachstum hemmt. Versuche, durch Verwendung der physiologisch sauren Salze Ammoniumchlorid oder Ammoniumsulfat hatten, wie der Versuch in Tabelle VI zeigt, keinen Erfolg, da der Säurerest nicht aus-

Tabelle VI. Acetat als Kohlenstoffquelle für *B. glycinophilus*.

Natrium-acetat %	Stickstoffquelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		
		3 ( $p_{\text{H}}$ )	4 ( $p_{\text{H}}$ )	6 ( $p_{\text{H}}$ )
0,5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ent- sprechend 0,2 %	3,24 (7,9)	3,46 (8,3)	3,32 (8,6)
1,0		4,61 (8,1)	4,97 (8,5)	5,26 (9,2)
5,0		0,29 (6,9)		0,22 (6,9)
0,5	$\text{NH}_4\text{Cl}$ ent- sprechend 0,2 %	3,39 (8,1)	3,39 (8,4)	3,53 (8,6)
1,0		4,18 (8,1)	5,33 (8,5)	4,90 (9,3)
5,0		0,14 (6,7)		0,14 (6,7)

Nährösung usw. wie in Tabelle IV.

reicht, den  $p_{\text{H}}$ -Wert herunterzudrücken. Dabei war hier die doppelte Menge an Stickstoff gegeben wie in den Versuchen der Tabellen IV und V (mit Ausnahme der höheren Gaben von Ammonacetat im Versuch der Tabelle IV). Auch eine Erhöhung der Acetatkonzentration gestaltete das Ergebnis nicht günstiger, ebensowenig eine in einem hier

<sup>1</sup> Der Stickstoffgehalt des Glykokolls beträgt theoretisch 18,67 %; es könnten mithin in 50 ccm Nährösung bei 0,1 % Glykokoll 9,3 mg Eiweiß-N erwartet werden, ein Wert, der indessen selten vollständig erreicht wird, so daß wir 8 mg im allgemeinen als Höchstwert annehmen können.

nicht mitgeteilten Versuch vorgenommene Erhöhung der Ammoniumchlorid- bzw. Ammonsulfatkonzentration bis auf 0,3 %.

Daß jedoch u. U. eine restlose Verarbeitung des Acetats möglich ist, zeigt der in der folgenden Tabelle VII wiedergegebene Versuch.

Tabelle VII. Acetat als Kohlenstoffquelle für *B. glycinophilus*.

Phosphatmischung	pH	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen			Eiweißkoeffizient nach Tagen		
		2	4	6	2	4	6
$KH_2PO_4/K_2HPO_4 = 0,4/0,2$	6,3				kein Wachstum		
$KH_2PO_4/K_2HPO_4 = 0,2/0,4$	6,9	4,90	7,78	7,93	12,2	18,0	18,0

Nährlösung: 0,5 % Na-Acetat als Kohlenstoff-, 0,146 %  $NH_4$ -Acetat als Stickstoffquelle. Sonst wie üblich. pH nach 6 Tagen 7,9.

Diese Kulturen wuchsen besonders gut: schon nach 2 Tagen und bereits nach 4 Tagen ist der theoretische Höchstwert von annähernd 8 mg Eiweißstickstoff erreicht. Es bleibt allerdings unklar, weshalb hier der pH-Wert nur bis auf 7,9 heraufging, während er nach den Tabellen IV und V auf etwa 9 hätte heraufgehen müssen. Es bleibt demnach unbestimmt, ob das Aufhören des Wachstums bei den Versuchen dieser Tabellen auf den hohen pH-Wert an sich oder auf Ammoniakverdunstung zurückzuführen ist. Bevor diese Frage weiter erörtert wird, sei auf weitere Ergebnisse der Tabelle VII hingewiesen: Man sieht, daß bei einem Ausgangs-pH von 6,3 keine Entwicklung stattfindet, also bei einem pH-Wert, der bei Glykokoll und Zucker als Stickstoff- und Kohlenstoffquellen noch eine gute Entwicklung gewährleistet, wie unsere früheren Versuche zeigten. Weiter finden sich in Tabelle VII die Eiweißkoeffizienten angegeben, die, wie man sieht, mit einem Wert von 18 (gebildetes Eiweiß auf 100 verarbeitete Essigsäure) recht hoch sind. Die Bestimmung der Rest-Essigsäure erfolgte dabei durch Destillation und Titration. Der ökonomische Koeffizient beträgt also (bei einem Eiweißgehalt von 50 %, s. Rippel und Nabel) etwa 36, ist demnach recht hoch.

Da die Frage der Verarbeitung organischer Säuren als Kohlenstoffquellen bei Ammoniak als N-Quelle wegen des steigenden pH-Wertes und der Gefahr der Ammoniakverdunstung mit der üblichen Methodik nicht restlos zu lösen war, zudem Harnstoff und Nitrate als N-Quellen ausscheiden, wie unten S. 296 ff. noch zu zeigen sein wird, so führten wir noch den in Tabelle VIII wiedergegebenen Versuch durch mit Glykokoll als Stickstoffquelle und einem Ausgangs-pH-Wert von 7,2, der eine Reihe bemerkenswerter Ergebnisse brachte. Hier ist zunächst festzustellen, daß nunmehr Buttersäure weitaus am schnellsten verwertet wird; bereits nach 2 Tagen waren 6,31 mg Eiweiß-N festgelegt, während Glucose und Essigsäure mit 4,42 bzw. 4,93 mg noch stark zurückstehen.

Tabelle VIII. Verwertung organischer Säuren durch *B. glycophilus* bei schwach alkalischer Reaktion.

Kohlenstoffquelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen			mg Ammoniak-N je Kolben nach Tagen		
	2	4	9	2	4	9
Glucose 0,50 %	4,42	9,06	9,13	4,64	0,15	0,15
Ameisensäure 0,50 %	3,12	3,70	3,99	5,37	5,08	3,19
Äpfelsäure 0,50 %	2,68	4,13	4,21	3,77	3,63	2,32
Bernsteinsäure 0,50 %	3,41	3,70	4,64	5,37	5,37	4,21
Buttersäure 0,50 %	6,31	8,05	8,92	2,76	0,15	0,45
Citronensäure 0,50 %	1,67	2,03	2,03	0,15	0,44	0,44
Essigsäure 0,50 %	4,93	6,89	8,41	3,19	2,30	0,73
Glykolsäure 0,50 %	2,90	3,05	3,12	6,38	6,09	4,79
Glyoxylsäure 0,50 %	0,94	1,09	1,31	1,02	0,87	0,58
Milchsäure 0,50 %	2,90	3,05	3,12	6,10	5,95	4,93
Oxalsäure 0,50 %	1,09	1,31	3,94	0,44	0,58	0,73
Weinsäure	2,61	2,18	2,90	0,87	0,73	5,66

$p_H$ -Werte nach Tagen	2	4	9	$p_H$ -Werte nach Tagen	2	4	9
Glucose	7,6	7,2	7,2	Essigsäure	8,1	9,1	9,0
Ameisensäure	8,0	8,8	8,8	Glykolsäure	8,0	8,1	8,1
Äpfelsäure	7,5	8,5	8,5	Glyoxylsäure	7,8	8,0	8,1
Bernsteinsäure	8,0	8,0	8,1	Milchsäure	7,4	7,5	7,6
Buttersäure	7,7	8,2	8,6	Oxalsäure	7,4	7,4	7,4
Citronensäure	7,4	7,5	7,4	Weinsäure	7,4	7,4	8,1

Nährlösung: Glykokoll 0,1 %,  $K_2HPO_4$  0,5 %,  $MgSO_4$  0,01 %,  $FeSO_4$  0,01 %, Agar 0,1 %.  $p_H$  mit  $NaOH$  auf 7,2 gebracht. Sonst wie üblich. Die verwendeten Säuren werden titriert und von jeder entsprechend 0,50 % Säure gegeben.

Nach 4 Tagen hat Glucose aufgeholt und gibt den Maximalwert, der bei diesen Versuchen fast an den theoretischen Höchstwert herankommt (vgl. Anm. 1, S. 289), während Buttersäure wenig zurückbleibt, aber nach 9 Tagen mit der Glucose gleichsteht. Essigsäure bleibt hinter beiden ein wenig zurück.

Die ebenfalls in Tabelle VIII angegebenen Ammoniakzahlen zeigen, daß bereits nach 2 Tagen die Desaminierung des Glykokolls nahezu beendet ist, nur bei Essigsäure bleiben die Zahlen ein wenig zurück (Eiweiß-N +  $NH_3$ -N bei Glucose 9,06, bei Buttersäure 9,07, bei Essigsäure 8,12), was offenbar die etwas schlechtere Wirkung dieser Säure erklärt. Auf die langsame Wirkung der Essigsäure haben wir auch an anderer Stelle aufmerksam gemacht (S. 297). Entsprechend verhalten sich die  $p_H$ -Werte, die bei Butter- und Essigsäure am Schluß des Versuchs (nach 9 Tagen) 8,6 bzw. 9,0 betragen. Daß der Wert bei Essigsäure höher ist als bei Buttersäure, liegt natürlich daran, daß hier bei der Essigsäure infolge der kürzeren Kohlenstoffkette mehr Alkali auf die Einheit des Kohlenstoffs entfällt als bei der Buttersäure, was selbst-

verständlich auch für die übrigen Säuren gilt. Der  $p_{\text{H}}$ -Wert der Glucose ist bei 7,2 stehen geblieben, nachdem nach 2 Tagen ein schwacher Anstieg auf 7,6 erfolgte, offenbar infolge des aus der Desaminierung des Glykokolls gebildeten Ammoniaks.

Bei keiner der übrigen Säuren übersteigt die Menge des gebildeten Eiweißes 50 % des möglichen. Diese Grenze wird von Bernsteinsäure eben erreicht, die Ertragswerte bleiben bei allen übrigen Säuren darunter. Die Reihenfolge ist in absteigender Anordnung nach 9 Tagen: Bernstein-, Äpfel-, Ameisen-, Oxal-, Glykol- und Milch-, Wein-, Citronen-, Glyoxylsäure. Die letztgenannte brachte nur 1,31 mg Eiweiß-N, also eine Menge, die gemäß der eingangs gemachten Bemerkung restlos als durch Verarbeitung des Glykokolls allein (und des Agars) erklärt werden könnte. Diese Erklärung würde jedoch nicht ganz zutreffen. Denn die Ammoniakzahlen zeigen, daß hier höchstens eine ganz geringfügige Desaminierung des Glykokolls stattgefunden hat; es muß also etwas der Glyoxylsäure verarbeitet worden sein. Ausdrücklich sei noch festgestellt, daß in diesem Falle, ebenso in den anderen, in denen Ammoniak nur in geringer Menge auftrat, die blaue Farbe des Filtrates der Eiweißbestimmung (Glykokoll-Kupfer-Komplexverbindung!) das Nochvorhandensein des Glykokolls anzeigen, und zwar in entsprechender Stärke. Ebenso zeigt der bei Glyoxylsäure schon am 2. Tage auf 7,8 und später auf 8,1 gestiegene  $p_{\text{H}}$ -Wert eine gewisse Verarbeitung dieser Säure an, da der Anstieg nicht durch Ammoniakbildung erklärt werden kann. Ein zu hoher  $p_{\text{H}}$ -Wert kann für die schlechte Verarbeitung der Glyoxylsäure nicht unmittelbar verantwortlich gemacht werden, da bei Essigsäure vom 4. zum 9. Tage noch bei einem  $p_{\text{H}}$ -Wert von 9,1 eine deutliche Eiweißbildung erfolgt. Da Glyoxylsäure als Zwischenprodukt der Desaminierung des Glykokolls in Frage kommt, so haben wir uns bemüht, diese Säure bei der Verarbeitung von Glykokoll nachzuweisen — jedoch ohne Erfolg, während Janke und Tayenthal sowie Egami bei anderen Bakterien (*B. coli*, *mycoides*, Bakterien aus Gartenerde) der Nachweis geglückt ist. Natürlich ist das noch kein Beweis gegen die Entstehung dieser Säure bei *B. glycinophilus*. Ob die schlechte Verwertung der Glyoxylsäure in unserem Falle durch Hemmung der Desaminierung des Glykokolls erklärt werden kann, lassen wir einstweilen dahingestellt.

Auch bei der Citronensäure, die am zweitschlechtesten verwertet wurde, war keine Desaminierung festzustellen, bei Weinsäure erst am 9. Tage. Ebenso zeigte Oxalsäure keine Desaminierung in größerem Umfange, obwohl eine solche in gewissem Umfange stattgefunden haben muß, da immerhin 3,94 mg Eiweiß-N nach 9 Tagen festgelegt waren. Äpfelsäure zeigte Desaminierung, aber keine vollständige, da im höchsten Falle die Summe von Eiweiß- und  $\text{NH}_3\text{-N}$  nur 7,76 betrug. Am 9. Tage erfolgte hier wieder eine Abnahme des Ammoniaks, die

offenbar auf Verdunstung bei der alkalischen Reaktion ( $p_{\text{H}}$  8,5) zurückzuführen ist. Ein solcher Rückgang findet sich auch bei Ameisen-, Bernstein-, Glykol- und Milchsäure bei gleicher Ursache.

In anderen Fällen wiederum (Ameisen-, Bernstein-, Glykol- und Milchsäure) erfolgte bereits nach 2 Tagen eine vollständige Desaminierung des Glykokolls; die Summe von Eiweiß- und Ammoniak-N beträgt hier 8,49, 8,78, 9,28 und 9,00. Trotzdem ist die Eiweißbildung vom 2. Tage an kaum mehr gestiegen. Da die gebildeten Eiweißmengen 3,99, 4,64, 3,12 und 3,12 kaum aus der Verarbeitung von Glykokoll allein (und Agar) zu erklären sind, so muß die Säure in gewissem Umfange verarbeitet worden sein. Es bleibt aber vorerst unklar, weshalb die Verarbeitung nicht weitergeht, zumal die Anfangskonzentrationen ja abnehmen, somit die „Giftigkeit“ sich verringern muß. Auch die Alkalisierung kann nicht die Ursache des Aufhörens sein, aus dem oben S. 292 für die Glyoxylsäure bereits erwähnten Falle, besonders nicht für die Milchsäure, bei der das  $p_{\text{H}}$  auf nur 7,6 steigt. Man muß also entweder annehmen, daß die Säure bereits völlig zerstört ist; das kann aber z. B. bei der Milchsäure nicht der Fall sein, da sonst der  $p_{\text{H}}$ -Wert höher sein müßte, jedenfalls höher als bei der Buttersäure. Oder man muß annehmen, daß die jeweilige Säure teilweise angegriffen ist, das entstehende Produkt aber giftig wirkt oder nicht weiter verarbeitet werden kann.

Insgesamt ergibt sich also ein äußerst verschiedenes Bild in der Verarbeitung der geprüften organischen Säuren. In Hinsicht auf die Verarbeitung des Glykokolls bzw. dessen Desaminierung stellen wir noch einmal übersichtlich zusammen; wobei die in ( ) gesetzten Zahlen die Eiweißwerte des Eiweißstickstoffs nach 2 Tagen bedeuten, einem Zeitpunkt also, zu dem offenbar der primäre Angriff auf die Kohlenstoffquelle bereits erfolgt ist:

1. Fehlende Desaminierung des Glykokolls: Citronensäure (1,67), Glyoxylsäure (0,94), Oxalsäure (1,09).

2. Verspätete Desaminierung des Glykokolls: Weinsäure (2,61).

3. Unvollständige Desaminierung: Äpfelsäure (2,68).

4. Vollständige Desaminierung ohne entsprechende Eiweißbildung: Ameisensäure (3,12), Bernsteinsäure (3,41), Glykolsäure (2,90), Milchsäure (2,90).

5. Vollständige Desaminierung mit vollständiger Eiweißbildung: Buttersäure (6,31), Essigsäure (4,93), Glucose (4,42).

Danach entspricht also die Stärke der Eiweißbildung durchaus der Stärke der Desaminierung. Es wäre verführerisch, daraus den Schluß ziehen zu wollen, daß die Höhe der Desaminierung der primär entscheidende Faktor für die Höhe der Eiweißbildung sei. Das ist aber schon aus dem Grunde nicht möglich, weil ja auch mit Ammoniak als

Stickstoffquelle die gleiche grundsätzliche Anordnung in der Verwertung der organischen Säuren sich zeigte, soweit die Versuchsbedingungen einen solchen Vergleich überhaupt ermöglichen, wie später (S. 307 ff.) zu zeigen sein wird. Es wird also richtiger sein, anzunehmen, daß die Desaminierung lediglich eine *Begleiterscheinung* der Verarbeitung der organischen Säuren ist, die mit der Eignung als Kohlenstoffquelle parallel geht. Über die jeweiligen Veränderungen, die dabei die Säure erleidet, könnten natürlich nur eingehende Untersuchungen Aufschluß geben. Auf weitere Gesichtspunkte werden wir unten noch zurückkommen.

Noch auf einen Punkt sei aufmerksam gemacht: Allgemein gesprochen können organische Säuren um so schlechter verwertet werden, je mehr sich die Reaktion dem sauren Bereich nähert. Im Falle der Essigsäure z. B. findet nach Tabelle VII bei  $p_H$  6,3 keine Verarbeitung statt, also bei einem  $p_H$ -Wert, bei dem nach Tabelle I und früheren Versuchen aus Glucose noch gute Eiweißbildung erfolgt, die nach Tabelle X sogar noch bei  $p_H$  5,95 maximal war. Das deutet darauf hin, daß es sich bei der „Giftigkeit“ der organischen Säuren nicht um eine primäre Wirkung der Wasserstoffionen handelt, auch nicht des Säurerestes, sondern offenbar um eine Wirkung des *ganzen*, undissoziierten Säuremoleküls, wie auch von verschiedenen Autoren schon angenommen wurde (Bach, Becker, Cohen u. Clark, Uppahl, Winslow u. Lochridge). Die beiden letztgenannten Autoren weisen z. B. darauf hin, daß *B. coli* mit Salzsäure noch bei einem  $p_H$ -Wert von 5,0 gut wächst, nicht aber bei einem solchen von 5,45, wenn dieser mit Essigsäure erzielt wird. Auch Ruschmann und Meyer stellten fest, daß *Coli*-Stämme anorganische Säuren besser vertragen als organische. Zweifellos handelt es sich dabei primär um eine Permeabilitätsfrage, die über die Konzentration *in* der Zelle entscheidet, als Vorstufe zur eigentlichen Verarbeitung, die dort einsetzt und zu den besonderen Wirkungen führt, wie sie oben gekennzeichnet wurden.

*B. glycinophilus* verhält sich hinsichtlich der Kohlenstoffquellen recht eigenartig: Von den Monosen verwertet er nur die Glucose in größerem Umfange, von organischen Säuren insbesondere die Essigsäure. Wenn er auch bei schwach alkalischer Reaktion Buttersäure noch besser verwertet, so geht die Verarbeitung der Essigsäure doch noch in den sauren Bereich, in dem eine Verarbeitung der Buttersäure nicht mehr stattfindet. Propionsäure stand uns im Augenblick leider nicht zur Verfügung; doch ist anzunehmen, daß ihre Verarbeitung zwischen der der Essig- und Buttersäure liegt. Es scheint, daß das Bakterium in vieler Hinsicht stoffwechselphysiologisch den von Bredemann und Werner beschriebenen buttersäureabbauenden Bakterien entspricht, obwohl es mit keiner der dort erwähnten Arten identisch sein dürfte.

Allerdings unterscheidet sich *B. glycinophilus* durch die schlechte Verarbeitung der Ameisensäure. Indessen sind die Versuche von *Bredemann* und *Werner* nur qualitativ, und eine gewisse Verarbeitung der Ameisensäure erfolgte auch bei uns. Jedenfalls könnte ein genauer Vergleich der verschiedensten Bakterien nur auf quantitativer Grundlage erfolgen. Dann wäre auch zu prüfen, wie sich die *Bredemannschen* Bakterien der Bernstein- usw. Säure gegenüber verhalten.

Im übrigen würde *B. glycinophilus* sich stark von sonstigen geprüften Bakterien unterscheiden. Nach einer kurzen, von *Franke* und *Peris* gegebenen Zusammenstellung gehören gemäß den Untersuchungen von *Ayers*, *Rupp* und *Johnson*, *Braun* u. Mitarbeitern, den *Dooren de Jong*, *Maassen* u. a. (zahlreiche Angaben finden sich bei *Buchanan* und *Fulmer*) Milch-, Brenztrauben-, Bernstein-, Fumar-, Äpfel- und Citronen-, auch Essig-, Propion- und Buttersäure zu den generell durch Bakterien am besten verwertbaren Säuren. Sie selbst fanden eine ähnliche Eignung bei verschiedenen Bakterien, mit Ausnahme der Citronensäure, bei Prüfung der Verwendbarkeit ruhender Bakterien zur Dehydrierung. Es kann also nicht überschien werden, daß gerade die größere Anzahl der als „gut“ verwertbar geltenden Säuren von unserem Bakterium schlecht verwertet werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Ergebnisse der genannten Autoren meist nur qualitativer Natur sind, einschl. des Nachweises der Säureverwendung durch Bestimmung des gebildeten Alkalis. Ein Blick auf die obige Tabelle VIII zeigt, daß diese in keiner Weise geeignet ist. Auch *Maassen* stellte ja schon fest, daß z. B. Ameisensäure zwar verarbeitet, aber nicht zur Neubildung von Zellsubstanz verwendet werden kann, welche Beobachtung wohl auch aus den oben S. 291 ff. mitgeteilten Ergebnissen hervorgeht.

Hier sei insbesondere noch auf folgendes hingewiesen: Die biochemische Erforschung des Säureabbaues durch Mikroorganismen arbeitet in neuerer Zeit mit der Methode der „ruhenden Bakterien“; so wurden u. a. die Ergebnisse von *Franke* und *Peris* gewonnen. Für die rein biologische Betrachtung ist diese Methode indessen *primär* weniger geeignet, was ausdrücklich festgestellt werden muß, so wichtig sie auch für die Aufklärung des Chemismus sein mag. Denn für uns handelt es sich darum, wieviel an Zellmasse (bzw. an Eiweiß im vorliegenden Falle) der Organismus aus einer gegebenen Menge einer Kohlenstoffverbindung zu bilden vermag. Der Chemismus spielt dabei erst eine sekundäre Rolle und kann gegebenenfalls das Warum der Eignung oder Nichteignung erklären. Oder anders ausgedrückt: Unsere mehr biologische Betrachtungsweise soll die Wirkung des Zusammenspiels aller gegebenen Möglichkeiten im Lebensablauf erfassen, worüber das Herausnehmen nur eines, sozusagen stationären, Vorganges noch keinen Aufschluß geben kann. Über die Ökonomie des Stoffwechsels vermag die Methode der „ruhenden Bakterien“ natürlich ebenfalls nichts auszusagen.

Es sei in diesem Zusammenhange noch darauf hingewiesen, daß z. B. bei der Alkoholgärung der *Hefe* sich offensichtliche Unstimmigkeiten ergeben

haben zwischen den aus der Verwendung von Hefepreßsaft erzielten Ergebnissen und der tatsächlichen Arbeit der lebenden Zelle, wie die Ausführungen von *Nilsson* und *Nord* zeigen. Wir hoffen, durch unsere Versuche gezeigt zu haben, daß sich bei quantitativer Erfassung des Lebensablaufes mannigfache Abstufungen zeigen, die nicht mit einer elektiven biochemischen Methode zu erfassen sind, die aber von primärer Wichtigkeit für die Kenntnis des Gesamtstoffwechsels sind.

### Stickstoffquellen.

Tabelle IX zeigt zunächst einen Versuch mit gestaffelten Mengen an Stickstoff in verschiedener Form, bei 2 und 3 % Glucose. Die für Glykokoll aufgeführten Werte sind bereits früher (A. Rippel und K. Nabel, S. 367f.) besprochen, so daß hier nur kurz auf Unterschiede gegenüber den anderen Stickstoffquellen hingewiesen zu werden braucht.

Tabelle IX. Verschiedene Stickstoffquellen für *B. glycinophilus*.

Konzentration der Stickstoffquelle	mg Eiweißstickstoff je Kolben					
	Kulturdauer 2 Tage		Kulturdauer 4 Tage		Kulturdauer 6 Tage	
	2 % Zucker	3 % Zucker	2 % Zucker	3 % Zucker	2 % Zucker	3 % Zucker
Glykokoll	0,1 %	4,61	2,95	8,64	6,63	8,71
	0,2 %	3,74	2,16	15,41	4,75	17,50
	0,3 %	2,66	2,37	15,55	3,02	25,28
	0,4 %	2,45	2,66	4,61	3,39	23,91
	0,5 %	2,66	2,74	4,11	3,46	19,23
Harnstoff	0,04 %	1,22	1,37	1,37	1,15	1,23
	0,08 %	1,15	1,66	1,37	1,73	1,22
	0,12 %	1,24	0,79	1,88	1,80	1,88
	0,16 %	1,51	1,44	1,66	2,02	1,94
	0,20 %	2,23	1,37	1,93	1,88	2,66
Ammonacetat (mg N)	9,1 %	3,02	2,30	9,07	9,14	9,07
	18,0 %	0,72	0,72	6,48	2,95	17,56
	27,1 %	0,65	0,29	1,22	1,15	1,22
	36,6 %	0,72	0,58	1,08	1,22	1,15
	46,1 %	0,93	0,29	1,00	1,22	0,94
Ammonlactat (mg N)	9,3 %	1,59	1,58	2,30	2,31	3,03
	18,7 %	0,93	1,30	1,88	1,73	1,73
	28,0 %	1,15	1,22	1,58	1,88	2,31
	37,2 %	1,08	1,22	1,44	1,51	2,09
	46,6 %	1,15	1,22	1,37	1,80	2,09
Alanin	0,119 %	2,30	1,87	6,41	2,95	8,86
	0,238 %	1,22	1,08	1,66	1,80	5,41
	0,357 %	0,93	1,15	1,36	2,16	3,10
	0,476 %	1,51	1,80	2,44	1,95	4,47
	0,595 %	1,73	1,73	2,16	2,45	2,88

Nährlösung usw. wie bei Versuch Tabelle I.

*Harnstoff* wird von unserem Bakterium sehr schlecht verwertet, wobei allerdings auffallenderweise die Verwertung mit höherer Harn-

stoffkonzentration zwar wenig, aber deutlich ansteigt. Der höchste überhaupt erzielte Wert, 2,66 mg Eiweiß-N bei 2 % Zucker nach 6 Tagen entspricht einer Verwertung von nur 5,77 % des Harnstoff-Stickstoffs; der Wert 1,44 mg Eiweiß-N (geringste Harnstoffgabe, 3 % Zucker) entspricht einer Verwertung von 15,4 %. Da gerade die Eignung von Harnstoff als Stickstoffquelle interessierte, so wurde noch ein Vergleich mit Glykokoll bei verschiedener Phosphatpufferung, also verschiedener Konzentration der Wasserstoffionen, angesetzt, der folgende in Tabelle X niedergelegten Werte ergab. Die Verwertung von Harnstoff ist aber bei verschiedener Reaktion gleich schlecht, ebenso in weiteren Versuchen, auf deren Wiedergabe verzichtet werden kann.

Tabelle X. Harnstoff als Stickstoffquelle für *B. glycinophilus*.

K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub>	pH	mg Eiweiß-N je Kolben nach 3 Tagen bei	
		Glykokoll	Harnstoff
0/0,5	8,15	7,15	0,86
0,13/0,40	7,15	7,87	1,10
0,52/0,10	5,95	7,39	0,95
0,58/0,06	5,60	0,76	0,29

Nährlösung sonst wie üblich. N-Quelle 0,1 bzw. 0,04 %.

*Ammoniumacetat* hat im Versuch der Tabelle IX recht günstig gewirkt, jedoch nur in den beiden 0,1 und 0,2 % Glykokoll entsprechenden Konzentrationen, während die höheren schädlich wirkten. Allerdings bleibt die Wirkung der beiden niedrigsten Konzentrationen nach 2 Tagen noch weit hinter der des Glykokolls zurück, holt nach 4 Tagen bei der geringsten und nach 6 Tagen bei der nächsthöheren Gabe auf. Bei 3 % Zucker liegen die Werte sogar noch höher als bei Glykokoll. Die Wirkung ist dann quantitativ. Da der pH-Wert hier 6,3 betrug, so sieht man, daß das Bakterium zwar das Ammoniak des Ammonacetats zu verwerten vermag, bei gleichem pH-Wert aber nicht das Acetat, wenn dieses als alleinige Kohlenstoffquelle geboten wird, wie aus dem Versuch in Tabelle VII hervorging.

Zur Herstellung der Nährlösung sei noch bemerkt, daß alle Lösungen auf pH 6,3 eingestellt wurden. Da Ammoniumacetat und Ammoniumlactat namentlich in höheren Gaben die Nährlösung säuersten (bis zu pH 5,7), so wurde zum Ansatz der Lösungen eine Ammoniumacetat- bzw. -lactatlösung verwendet, die einen etwas geringeren Stickstoffgehalt aufwies als gefordert wurde; dann wurde Ammoniak hinzugesetzt, bis der pH-Wert 6,3 erreicht war, wobei diese Lösungen so ausprobiert waren, daß sich der zu fordernde Stickstoffgehalt ergab, der dem N-Wert des Glykokolls entsprach. Es wurde die stärkste Acetat- bzw. Lactatlösung angesetzt und für die übrigen Reihen entsprechend verdünnt. Eine solche Mischung war für das Acetat 20 g Ammoniumacetat (12% N) + 900 ccm n/10 Ammoniak auf 2 Liter (= 2,4 g

Ammoniumacetat-N und 1,26 g Ammoniak-N). Die übrige Nährlösung wurde gesondert in höherer Konzentration hergestellt, und durch entsprechende Mischung die endgültige Nährlösung erzielt. Für das Ammoniumlactat ergab sich 37 g Ammoniumlactat + 350 ccm n/10 Ammoniak auf 2 Liter. Ausdrücklich sei betont, daß der Stickstoffgehalt nach dem Sterilisieren nachgeprüft wurde; eine Veränderung ergab sich nicht.

*Ammoniumlactat.* Die Wirkung ist zwar nicht besonders gut, aber doch deutlich besser als die von Harnstoff. Mit 3,32 mg Eiweiß-N als Maximum ergab sich bei der geringsten Stickstoffgabe eine Ausbeute von 35,7 % des zugesetzten Stickstoffs, bei der nächsthöheren ist die Ausbeute nur halb so hoch. Die Wirkung steigt offensichtlich mit der Zeit an. Bemerkenswert ist vor allem, daß sie bei 3 % Glucose zwar wenig, aber deutlich besser ist als bei 2 %, wie namentlich der Vergleich nach 6 Tagen zeigt; bei Glykokoll ist gerade das gegenteilige Verhalten zu beobachten.

*Alanin.* Im Vergleich zum Glykokoll überrascht die starke Unterlegenheit des Alanins, die sich einerseits in einer stärkeren zeitlichen Verzögerung der Wirkung bei 0,119 % Alanin, andererseits darin ausdrückt, daß nur bei dieser niedrigsten Gabe der theoretische Wert erreicht wird, während die Verarbeitung der nächsthöheren Gabe maximal (6 Tage und 3 % Glucose) nur zu rund 50 % erfolgte, und die noch höheren Gaben nur eine sehr mäßige Verwertung zeigten. Verglichen mit dem Ammoniumacetat ist die Wirkung des Alanins deutlich schlechter.

Immerhin müssen wir zugeben, daß sich die Unterlegenheit des Alanins dem Glykokoll gegenüber bei unseren Versuchen nicht immer zeigte. Wir stellen in der folgenden Tabelle XI eine Reihe weiterer Versuche zusammen, weitere finden sich in den Tabellen XII und XIII, sowie in der Übersicht S. 304, unten. Man sieht, daß zwar das Alanin dem Glykokoll nicht immer in der gleichen Intensität unterlegen ist wie im Versuch der Tabelle IX, daß aber eine Unterlegenheit immer vorhanden ist, die sich vor allem, im Falle der günstigsten Wirkung des Alanins, in der zeitlichen Verzögerung, verglichen mit der Glykokollwirkung, äußert. Sie zeigt sich ferner darin, daß die schädliche Wirkung höherer Aminosäure — bei gleicher Zuckerkonzentration bzw. höherer Zucker — bei gleicher Aminosäurekonzentration beim Alanin stärker in Erscheinung tritt als beim Glykokoll. Daß die Versuche nicht quantitativ reproduzierbar ausfallen, braucht nach unseren bisherigen Erfahrungen nicht wunder zu nehmen; wir haben früher schon ausdrücklich auf die Unregelmäßigkeit im Ausfall von zu verschiedenen Zeiten angesetzten Versuchen hingewiesen (A. Rippel u. K. Nabel, S. 369; man vgl. auch den „Wetterfaktor“ von Bortels).

Weiterhin wurde noch Asparagin und Glutaminsäure geprüft, und zwar bei gleichen Zuckerkonzentrationen wie bei dem Versuch in

Tabelle XI.

Vergleich zwischen Glykokoll und Alanin als N-Quellen für  
*B. glycinophilus*.

N-Quelle	C-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen	
		2	4
<b>Versuch 1.</b>			
Glykokoll	0,1 %	Glucose 0,5 %	6,55
"	0,1 %	" 1,0 %	6,19
"	0,2 %	" 0,5 %	5,55
"	0,2 %	" 1,0 %	6,46
Alanin	0,119 %	" 0,5 %	4,90
"	0,119 %	" 1,0 %	5,69
"	0,238 %	" 0,5 %	3,67
"	0,238 %	" 1,0 %	1,80
<b>Versuch 2.</b>			
Glykokoll	0,2 %	Glucose 0 %	2,73
"	0,2 %	" 0,5 %	6,55
"	0,2 %	" 1,0 %	1,87
Alanin	0,238 %	" 0 %	1,58
"	0,238 %	" 0,5 %	2,16
"	0,238 %	" 1,0 %	1,08
<b>Versuch 3.</b>			
Glykokoll	0,1 %	Glucose 1,0 %	7,39
Alanin	0,119 %	" 1,0 %	5,47

Nährlösung usw. wie in Tabelle I.

Tabelle XI; die Zahlen finden sich in Tabelle XII. Auf das Verhalten des Alanins wurde bereits eingegangen. Asparagin wurde ohne Zucker schlechter verwertet als Glykokoll, ebenso mit 0,5 % Glucose nach 2 Tagen, während seine Wirkung nach 4 Tagen aufgeholt hat. Sie ist jetzt sogar besser als bei Glykokoll, und auch bei 1,0 % Zucker wirkte Asparagin etwas besser als Glykokoll. Die Zahlen zeigen weiterhin daß auch der Amidstickstoff des Asparagins angegriffen wird, da im Höchstfalle 12,31 mg Eiweißstickstoff gebildet sind, während aus dem Aminostickstoff allein nur etwa 9 mg hätten entnommen werden können. Glutaminsäure wurde bedeutend besser verwertet als Glykokoll, und zwar bei Vorhandensein oder Fehlen von Glucose; in diesem Falle war die Verwertung sogar recht gut. Erwähnt sei dabei noch, daß die Nährlösung mit Glutaminsäure durch diesen Zusatz auf  $p\text{H}$  5,5 kam, aber mit NaOH auf 6,3 gebracht wurde, dem Werte der übrigen, da sonst das Wachstum schlecht war, wie andere Versuche zeigten. Auch bei Asparagin und Glutaminsäure hemmte 1 % Glucose gegenüber 0,5 % noch stärker beim Alanin, wie die Werte nach 4 Tagen zeigen.

Wir führten weiter den in Tabelle XIII wiedergegebenen Versuch durch, bei dem Glykokoll, Alanin, Leucin und Ammoniumlactat bei

Tabelle XII. Wirkung verschiedener Aminosäuren als N-Quellen für *B. glycinophilus*.

N-Quelle	C-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen	
		2	4
Glykokoll	0,2 %	Glucose 0 %	2,52
	0,2 %	„ 0,5 %	7,63
	0,2 %	„ 1,0 %	1,87
Alanin	0,238 %	„ 0 %	1,08
	0,238 %	„ 0,5 %	1,51
	0,238 %	„ 1,0 %	1,08
Asparagin	0,177 %	„ 0 %	1,37
	0,177 %	„ 0,5 %	3,24
	0,177 %	„ 1,0 %	2,44
Glutamin- säure	0,393 %	„ 0 %	8,50
	0,393 %	„ 0,5 %	13,47
	0,393 %	„ 1,0 %	12,03
			2,74
			10,30
			9,00
			2,59
			6,55
			1,66
			2,02
			12,31
			10,01
			7,75
			21,09
			14,83

Nährlösung usw. wie in Tabelle I; die N-Werte entsprechen jeweils 0,2 % Glykokoll.  $p_{\text{H}}$  6,3.

verschiedener Phosphatpufferung verglichen wurden. Alanin hat dieses Mal also bei beiden Pufferungen ebenso gut gewirkt wie Glykokoll was offenbar an dem schnellen Wachstum des Bakteriums liegt, das bereits nach 2 Tagen das Maximum an Eiweiß gebildet hat. Leucin wurde bei der stärker sauren Pufferung schlecht, besser bei der weniger sauren verwertet, jedoch nicht so gut wie Glykokoll und Alanin. Da der  $p_{\text{H}}$ -Wert am Schluß des Versuchs 6,3 betrug, so kann die Konzentration der Wasserstoffionen nicht ohne weiteres für die schlechtere Wirkung verantwortlich gemacht werden. Auf diese Frage wird später noch zurückzukommen sein. Ammoniumlactat hatte bei der stärker sauren Pufferung kaum eine Wirkung, eine mäßig gute bei der schwächer sauren.

Die in Tabelle XIII noch für Leucin angegebenen Ammoniakwerte zeigen, daß dieses zwar desaminiert ist, aber trotzdem nicht zur Wirkung kommt. Es ist also nicht unangreifbar, muß aber irgendwie giftig wirken. Es bestätigt sich also auch für das Leucin die früher von uns (Rippel und Nabel) für das Glykokoll gemachte Feststellung (vgl. auch Tabelle VIII der vorliegenden Arbeit), daß die Verarbeitung der Aminosäure über die Desaminierung geht.

In Tabelle XIV sind zwei (zu verschiedenen Zeiten angesetzte) Versuche mit den Ammoniaksalzen einiger niedrigmolekularer organischer Säuren wiedergegeben, außerdem ist in Versuch 2 Ammoniumphosphat aufgenommen, das, wie man sieht, verhältnismäßig gut gewirkt hat, wenn auch dem Glykokoll gegenüber mit zeitlicher Verzögerung, wie schon frühere Versuche zeigten. Im übrigen wurden, wie

Tabelle XIII. Wirkung verschiedener Pufferung auf die Verarbeitung einiger Stickstoffquellen durch *B. glycinophilus*.

Pufferung	N-Quelle	(pH)	mg Eiweiß-N je Kolben nach 2 Tagen	(pH)	mg NH <sub>3</sub> -N je Kolben nach 2 Tagen
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> = 0,4/0,2 pH 6,3	Glykokoll	(6,4)	7,78		
	Alanin	(6,3)	7,35	(6,1)	0,93
	Leucin	(6,2)	2,30	(6,0)	5,83
	NH <sub>4</sub> -Lactat		0,72		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> = 0,2/0,4 pH 6,9	Glykokoll	(6,8)	7,27		
	Alanin	(6,4)	7,49	(6,7)	0,58
	Leucin		5,33	(6,3)	2,23
	NH <sub>4</sub> -Lactat		4,11		

Nährlösung usw. sonst wie in Tabelle I. Glucose 1,0 %, N-Quelle entsprechend 0,1 % Glykokoll.

man sieht, die Ammoniaksalze der geprüften Säuren nicht voll verwertet, mit Ausnahme des Acetats, in diesem Falle jedoch erst nach 6 Tagen Kulturdauer, was bis zu einem gewissen Grade die früher (S. 297) gemachte Erfahrung der langsamen Wirkung des Ammoniumacetats bestätigt; zweifellos ist das hier die Folge der ursprünglich zu hohen Konzentration der Wasserstoffionen, die erst durch Verarbeitung gesenkt wird. Auffallend ist noch die gute anfängliche Wirkung des oxalsauren Ammoniaks schon nach 2 Tagen, die aber dann nicht mehr weitergeht, möglicherweise wegen der Reaktionsverschiebung, wie sich im nächsten Versuch zeigen wird.

Im Versuch 2 der Tabelle XIV haben wir auch eine Mischung der geprüften Ammoniaksalze gegeben, wobei selbstverständlich die Konzen-

Tabelle XIV. Niedrig molekulare organische Säuren als N-Quellen für *B. glycinophilus*.

N-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen			Ausgangs-pH-Wert
	2	4	6	
<b>Versuch 1.</b>				
Glykokoll .....	8,00	8,00	7,71	
glyoxylsaurer NH <sub>3</sub> .....	1,66	3,88	5,12	
glykolsaurer NH <sub>3</sub> .....	2,16	3,67	4,75	
oxalsaurer NH <sub>3</sub> .....	4,24	4,36	4,03	
<b>Versuch 2.</b>				
a) Glykokoll .....	7,64	7,63	7,78	6,2
b) glyoxylsaurer NH <sub>3</sub> .....	1,73	3,53	5,33	6,2
c) essigsaurer NH <sub>3</sub> .....	0,65	0,29	7,49	5,7
d) Ammoniumphosphat .....	2,66	6,12	7,49	6,6
e) Mischung b-d .....	5,25	6,91	8,07	6,1

Nährlösung usw. wie in Tabelle I. Stickstoffmengen entsprechend 0,1 % Glykokoll.

tration des einzelnen Salzes  $\frac{1}{3}$  der Menge betrug, die bei alleiniger Verwendung gegeben wurde. Diese Mischung hat eine die Wirkung jedes einzelnen Salzes weit übertreffende Wirkung ergeben, wie namentlich die Zahlen nach 2 Tagen zeigen. Hierauf wird gleich zurückzukommen sein (S. 303).

Mit den bisher verwendeten Säuren haben wir, unter Hinzunahme des milchsauren Ammoniaks, den weiteren Versuch der Tabelle XV angestellt, in dem der  $p_{\text{H}}$ -Wert einheitlich auf 6,4 gebracht und außerdem

Tabelle XV. Ammoniaksalze verschiedener organischer Säuren als N-Quellen für *B. glycinophilus* bei einheitlichem Anfangs- $p_{\text{H}}$ -Wert (6,4).

N-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen					
	2	( $p_{\text{H}}$ )	4	( $p_{\text{H}}$ )	6	( $p_{\text{H}}$ )
1. Glykokoll 0,1 % ....	6,98	(6,4)	7,56	(6,3)	7,78	(6,3)
2. glyoxylsaures $\text{NH}_3$ ..	0,79	(6,4)	2,73	(6,2)	5,11	(5,9)
3. glykolsaures $\text{NH}_3$ ...	1,37	(6,4)	3,89	(6,1)	4,75	(5,9)
4. essigsaures $\text{NH}_3$ ....	4,90	(6,8)	7,49	(6,6)	7,92	(6,5)
5. milchsaures $\text{NH}_3$ ....	1,15	(6,4)	2,58	(6,2)	3,88	(6,1)
6. oxalsaures $\text{NH}_3$ ....	2,30	(6,0)	3,75	(5,9)	4,68	(5,9)
7. Mischung 2-6 .....	3,10	(6,4)	5,69	(6,3)	7,78	(5,9)

Die entsprechenden Ammoniakzahlen in der Nährlösung sind:

1.	1,15	0,22	0,22
2.	7,85	4,97	2,95
3.	7,20	4,61	4,18
4.	3,50	0,21	0,36
5.	6,91	5,26	4,03
6.	6,19	3,89	3,50
7.	4,97	2,09	0,29

Nährlösung usw. wie in Tabelle I. Alle Lösungen mit  $\text{NaOH}$  auf  $p_{\text{H}}$  6,4 gebracht. Ammoniaksalze entsprechend 0,1 % Glykokoll.

das jeweilig vorhandene Ammoniak bestimmt wurde. Wie man sieht, entsprechen die Eiweißmengen völlig denen der Tabelle XIV. Die jeweiligen Ammoniakzahlen zeigen weiterhin, daß sich der nicht-verarbeitete Anteil noch restlos in der Nährlösung befand. Die weitere Besprechung des Einflusses der  $p_{\text{H}}$ -Werte geben wir nach Darstellung der Versuche und führen weiter in Tabelle XVI einen weiteren Versuch an mit den gleichen Ammoniaksalzen organischer Säuren wie im Versuch der Tabelle XV, wobei jedoch der  $p_{\text{H}}$ -Wert einheitlich auf 7,1 gebracht wurde.

Essigsäures und milchsaures Ammoniak hatten also fast so gut gewirkt wie Glykokoll. Glyoxylsaures und glykolsaures Ammoniak hatten schlechte Wirkung, aber das Ammoniak war fast restlos verflüchtigt. Aber auch das oxalsäure Ammoniak hat schlecht gewirkt, obwohl hier das unverbrauchte Ammoniak noch vorhanden war. Der

Tabelle XVI. Ammoniaksalze verschiedener organischer Säuren als N-Quellen für *B. glycinophilus* bei einheitlichem  $p_H$ -Wert (7,1).

N-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach 2 Tagen	mg $NH_3$ -N	$p_H$
1. Glykokoll 0,1 %	7,13	0,36	6,8
2. glyoxylsaures $NH_3$	1,00	1,07	7,1
3. glykolsaures $NH_3$	1,51	0,72	7,0
4. essigsäures $NH_3$	6,98	0,22	7,1
5. milchsaures $NH_3$	6,28	0,58	6,5
6. oxalsäures $NH_3$	1,95	5,48	6,9
7. Mischung 2—6	4,83	0,36	6,7

Nährlösung usw. wie in Tabelle XV.  $p_H$  einheitlich mit NaOH auf 7,1 gebracht.

Fall des milchsauren Ammoniaks zeigt offenbar, daß der Wasserstoffionenkonzentration eine bedeutsame Rolle bei der Eignung der jeweiligen organischen Säure als Stickstoffquelle zukommt. Diese Frage wird noch einmal im Zusammenhang zu besprechen sein.

Auch bei den Versuchen der Tabellen XV und XVI haben die Mischungen besser gewirkt als den Einzelkomponenten entsprechen würde. Im Falle der Tabelle XIV wäre die bessere Wirkung der Mischung dadurch zu erklären, daß bei alleinigem Zusatz von Ammoniumacetat der  $p_H$ -Wert zu ungünstig ist (5,7), bei der weniger sauren Mischung also  $1/3$  des Ammoniumacetats voll hätte zur Wirkung kommen können. Doch kann diese Erklärung nicht ganz befriedigen, da der Eiweißwert der Mischung zu hoch ist. Es würde nämlich auf  $1/3$  der Essigsäure dann 2,5 mg Eiweiß-N entfallen (Endwert nach 6 Tagen, geteilt durch 3, unter der Annahme, daß bei geringerer Konzentration die Verarbeitung bereits nach 2 Tagen quantitativ erfolgt sei), auf die beiden anderen Säuren aber 0,58 bzw. 0,89, zusammen demnach 4,47 mg (nach 2 Tagen), 1,18 bzw. 2,04, zusammen 5,72 (nach 4 Tagen) und 1,78 bzw. 2,5, zusammen 6,78 (nach 6 Tagen), was immerhin noch unter den tatsächlichen gefundenen Werten liegt. Da aber der  $p_H$ -Wert der Mischung etwas tiefer liegt als der der Einzelsalze Ammoniumglyoxalat und -phosphat, so wäre für diese eher noch weniger zu erwarten gewesen. Klarer liegen die Dinge bei der Tabelle XV mit einheitlichem Ausgangs- $p_H$ . Hier würden sich folgende Zahlen ergeben:

	2 Tage	4 Tage	6 Tage
Mischung gefunden	3,10	5,69	7,78
Summe der Einzelanteile	2,10 (2,70)	4,09 (4,17)	5,27

wobei an den Erntetagen  $1/5$  der Werte der jeweiligen Einzelsalze eingesetzt sind. Die Zahlen liegen in der Mischung also tatsächlich höher

als sie nach der Wirkung der Einzelsalze zu erwarten wären. Die Zahlen in ( ) bedeuten die Werte, die gewonnen werden, wenn für das Ammoniumacetat an *allen* Tagen der Höchstwert nach 6 Tagen eingesetzt wurde, wie in dem ersterwähnten obigen Beispiel.

Diese Beobachtung scheint uns recht bemerkenswert zu sein. Einmal geht daraus hervor, daß die schädliche Wirkung der einzelnen Stoffe sich nicht etwa summiert, sonst hätte die Mischung keinen erheblich besseren Wert ergeben können als im Höchstfalle eine einzelne Komponente bei voller Konzentration (5,25 mg Eiweiß-N bei Mischung gegen 2,66 mg bei Ammoniumphosphat in Tabelle XIV). Man muß demnach annehmen, daß jeder Stoff eine besondere, von der der anderen unabhängige Wirkung entfaltet oder aber ein Stoff die Wirkung eines anderen antagonistisch beeinflußt. Falls keine antagonistische Wirkung anzunehmen wäre, so würde die einfachste Erklärung die sein, daß die Herabsetzung der Konzentration jeder Komponente in der Mischung die Ursache der besseren Wirkung der Mischung ist. In der Tat ist auch in Tabelle XVII bei Ammoniumnitrat, -chlorid und -sulfat keine bessere Wirkung der Mischung zu beobachten, weil dort offenbar die Konzentration der Wasserstoffionen, die bei diesen Säuren natürlich einheitlich ist, die herrschende Rolle spielt. Hier jedenfalls scheint also ein antagonistischer Faktor zurückzutreten.

Sodann aber liegt es nahe, auf die bekannte Tatsache hinzuweisen, daß vielfach ein Gemisch von Aminosäuren eine erheblich bessere Wirkung entfaltet als eine einzelne Aminosäure. Auch diese Wirkung könnte sich zwangsläufig einfach durch Herabsetzung der schädlichen Konzentration der Aminosäuren im Gemisch erklären, ohne daß man zur Erklärung seine Zuflucht zur Annahme der Notwendigkeit besonderer Bausteine nehmen müßte. Im Falle der Tabelle XIV liegen die Dinge wohl klar: Die Wirkung von Ammoniumacetat und Ammoniumphosphat kann wohl nicht so aufgefaßt werden, daß beide Komponenten als Bausteine nötig sind, da ja der Kohlenstoffbedarf aus Zucker gedeckt werden kann und Phosphorsäure sowieso in der Nährlösung vorhanden ist. Hinsichtlich der Aminosäuren steht uns noch ein Versuch zur Verfügung, der für Glykokoll und Alanin die gleiche Erscheinung zeigt:

0,2 % Glykokoll .....	12,46 mg Eiweiß-N	nach	2	Tagen
0,2 % Alanin .....	2,95	„	„	2
0,1 % Glykokoll + 0,1 % Alanin	14,91	„	„	2

Nährlösung usw. sonst wie in Tabelle I.

Auch hier hat die Mischung erheblich besser gewirkt, vor allem, wenn man mit dem Alanin vergleicht. Selbstverständlich soll damit nicht gesagt sein, daß nicht der eine oder andere Organismus eine bestimmte Aminosäure brauchte. Aber die geschilderte Erscheinung wäre bei Mischungen zunächst besonders zu beachten.

Die Wirkung anorganischer Stickstoffquellen zeigt Tabelle XVII in zwei zu verschiedenen Zeiten angesetzten Versuchen. Nitrat wird demnach so gut wie nicht verwertet, das gebildete Eiweiß kann ungefähr aus dem Agar allein stammen (S. 285), die Ammoniaksalze wirken annähernd gleich gut; ihre Wirkung bleibt aber weit hinter der des Glykokolls zurück, auch nach 6-tägiger Kulturdauer. Offenbar hemmt hier schließlich die saure Reaktion auch bei dem Ammoniumnitrat, dessen  $\text{NH}_4$ -Anteil lediglich zur Wirkung kommt, wie man aus Versuch 2 ersieht, bei dem der  $\text{NH}_4$ -Anteil entsprechend 0,1 % Glykokoll gegeben wurde, während bei Versuch 1 die gesamte Menge des Stickstoffs im Ammoniumnitrat gerechnet wurde. Würde der Nitratrest verbraucht, so könnte die Konzentration der Wasserstoffionen natürlich auch nicht in dem beobachteten Maße steigen. Die Mischung, die in Versuch 2 hinzugenommen wurde, hatte keine bessere Wirkung als die jeweiligen Einzelsalze (vgl. vorige Seite).

Tabelle XVII.

Anorganische Stickstoffquellen für *B. glycinophilus*.

## Versuch 1.

N-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		
	2	4	6
Glykokoll 0,1 % .....	7,49	7,92	7,85
Ammoniumsulfat .....	2,37	3,32	4,39
Ammoniumnitrat .....	1,66	4,18	4,54
Kaliumnitrat .....	0,36	0,34	0,58

## Versuch 2.

N-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		pH-Wert nach Tagen	
	3	6	3	6
a) Glykokoll 0,1 % ...	7,71	7,92	6,0	6,0
b) Ammoniumnitrat ..	3,53	4,75	5,5	5,45
c) Ammoniumsulfat ..	3,17	4,25	5,8	4,5
d) Ammoniumchlorid ..	2,44	4,32	5,2	5,35
e) Mischung b-d .....	3,31	4,54	5,75	5,4

Nährlösung usw. wie in Tabelle I.

Endlich führen wir noch den Versuch der Tabelle XVIII an bei zwei verschiedenen Phosphatpufferungen (6,8 bzw. 6,4). Man sieht, daß nunmehr das Ammoniumacetat eine gerade so gute Wirkung hatte wie das Glykokoll, was schon aus Tabelle XVI zu ersehen war. Hier ist aber noch deutlicher, daß nunmehr auch die zeitliche Hemmung bei der Verarbeitung von Ammoniumacetat verschwunden ist, wie sie in Tabelle XIV, Versuch 2, hervortrat, bei der weniger sauren Pufferung verschwunden ist, während sie bei der saureren Pufferung noch nach 4 Tagen in voller Höhe bestand, wie bei dem erwähnten obigen Versuch.

Tabelle XVIII. Stickstoffquellen für *B. glycinophilus* bei verschiedener Pufferung.

Pufferung	Aus-gangs- pH	N-Quelle	mg Eiweiß-N je Kolben nach Tagen		pH-Wert nach Tagen	
			2	4	2	4
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,4/0,2$	6,4	1. Glykokoll 0,1 %	7,85	8,14	6,05	6,0
		2. Ammoniumsulfat	2,66	3,67	5,85	5,4
		3. Ammoniumacetat	0,29	0,51	5,75	5,8
		4. Mischung 2-3	5,47	7,63	6,0	5,7
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,2/0,4$	6,8	1. Glykokoll 0,1 %	7,85	8,07	6,3	6,3
		2. Ammoniumsulfat	5,11	7,20	6,3	6,3
		3. Ammoniumacetat	7,92	8,14	6,3	6,1
		4. Mischung 2-3	7,63	7,85	6,2	6,0

Nährlösung usw. wie in Tabelle XVII.

Beachtenswert ist noch die gute Wirkung der Mischung von Ammoniumsulfat und Ammoniumacetat bei der stärker sauren Reaktion, die die Wirkung der beiden Einzelsalze weit übertrifft; die Ursache wird man in der Senkung der Konzentration und der Zunahme des  $p\text{H}$ -Wertes sehen können, wie oben angeführt wurde.

### Massenzüchtung im Lüftungsgefäß.

Es interessierte noch die Frage, welche Mengen von Bakterieneiweiß im Lüftungsversuch, wie bei Hefezüchtung, gebildet werden können. Wir verwendeten das von *Kluyver* angegebene Lüftungsgefäß von 1000 cem Inhalt, das mit 500 cem der normalen Nährlösung (etwa 2 % Glucose und 0,2 % Glykokoll) beschickt wurde. Von den 4 Gefäßen erhielten je zwei keinen, die beiden anderen den üblichen Agarzusatz von 0,1 %. Die jeweiligen beiden Gefäße wurden nach 4 und 6 Tagen geerntet. Tabelle XIX zeigt das Ergebnis. Absolut ist die gebildete Zellmasse gering; denn die vorhandene Menge an Glykokollstickstoff würde zur Bildung von 233 mg Eiweiß ausreichen, gegen 72,12 im er-

Tabelle XIX.  
Massenzüchtung von *B. glycinophilus* im Lüftungsversuch.

	Ohne Agar		Mit Agar	
	4 Tage	6 Tage	4 Tage	6 Tage
Zuckerverbrauch mg/100 cem .....	64	108	100	140
Gebildetes Eiweiß mg/100 cem .....	21,62	54,00	45,62	72,12
Trockensubstanz mg/100 cem .....	52,4	105,8	nicht bestimmt*	
Eiweiß in % der Trockensubstanz .....	41,3	51,0	"	
Eiweißkoeffizient .....	33,8	50,0	45,6	51,5
Ökonomischer Koeffizient .....	81,9	98,0	nicht bestimmt	

\* Wegen des Agarzusatzes nicht bestimmbar.

zielten Höchstfalle. Dementsprechend ist auch der Zuckerverbrauch gering, im Höchstfalle 140 mg von 2000 mg vorhandenem Zucker. Das röhrt zweifellos teilweise daher, daß wir nicht bei der optimalen Temperatur von 37° züchten konnten, sondern bei 28 bis 30° arbeiten mußten.

Davon abgesehen ergeben sich außerordentlich hohe Eiweißkoeffizienten, im geringsten Falle 33,8, im übrigen annähernd 50. Der ökonomische Koeffizient, der nur in den Kulturen ohne Agar bestimmt werden konnte, ist entsprechend ebenfalls hoch und erreicht nach 6 Tagen den Wert 100. Das ist, neben dem sparsamen Zuckerverbrauch, nur möglich dadurch, daß offenbar der Kohlenstoff des Glykokolls weitgehend verarbeitet wurde, wie wir das schon früher feststellten (*Rippel und Nabel*). Bemerkenswert ist noch, daß Eiweiß- und ökonomischer Koeffizient mit dem Alter der Kultur steigen. Das kann wohl nur so gedeutet werden, daß zunächst eine Desaminierung des Glykokolls erfolgt und danach erst die stärkere Verarbeitung einsetzt. Der Zusatz von Agar beschleunigte, wie man sieht, alle diese Vorgänge.

Wenn auch dieser Versuch nur orientierend zu werten ist, so zeigt er doch, daß auch bei Bakterien eine Massenzüchtung durchaus aussichtsreich, d. h. ökonomisch, erfolgen kann. Doch ist im vorliegenden Falle die je Volumeneinheit erzielbare Bakterienmasse sehr gering, da, wie gezeigt, nur sehr geringe Zuckermengen verbraucht werden, welcher Vorgang natürlich von der Ökonomie des Umsatzes unabhängig ist.

### Rückblick.

Die wesentlichsten Beobachtungen wurden im einzelnen bei der Darstellung der Einzelergebnisse bereits besprochen. Es bleibt noch übrig, kurz einen Vergleich zwischen den Befunden bei der Kohlenstoff- und Stickstoffernährung zu ziehen.

Was zunächst die organischen Säuren betrifft, so zeigt sich in gleicher Weise bei ihrer Darbietung einerseits als alleinige Kohlenstoffquelle und andererseits als Ammoniaksalz zur Stickstoffernährung in Gegenwart von Zucker als Kohlenstoffquelle eine bessere Wirkung bei weniger saurer bzw. schwach alkalischer Reaktion: So bei der Essigsäure in Tabelle VII und bei der Milchsäure in Tabelle XIII und insbesondere in Tabelle XVI, wo die Wirkung des Ammoniaksalzes fast an die des Ammoniumacetats herankommt. Diese Säuren üben demnach eine unmittelbar hemmende Wirkung aus, die jenseits ihrer Verarbeitbarkeit oder Nichtverarbeitbarkeit liegt. Wir haben oben S. 294 die Wirkung des ganzen Moleküls dafür verantwortlich gemacht.

Es ist weiter zu bemerken, daß die Ertragswerte der Ammoniaksalze organischer Säuren in Gegenwart von Zucker höher sind als bei

alleiniger Darbietung der Säure als Kohlenstoffquelle neben ihrem Ammoniaksalz als Stickstoffquelle. Wir verweisen z. B. auf die Oxalsäure (Tabelle IV und XV) und besonders die Glyoxylsäure (Tabelle IV und XV), in diesem Falle scgar bei günstigerem  $p_{\text{H}}$ -Wert in Tabelle IV. Es dürfte wohl klar sein, daß diese Erscheinung teilweise darauf zurückzuführen ist, daß die Konzentration der Säure geringer ist, wenn sie nur als Ammoniaksalz zur Stickstoffernährung neben Zucker gegeben wird. Denn im Falle der Milchsäure war in Tabelle VIII 0,5 % gegeben, während Ammoniumlactat in Gegenwart von Zucker (entsprechend 0,1 % Glykokoll) nur etwa  $1/4$  bis  $1/5$  dieser Konzentration ausmachte. Infolge der „Giftigkeit“ höherer Konzentrationen, die schon bei 1 % Glucose in Erscheinung treten kann, noch mehr aber bei organischen Säuren, wie die bessere Wirkung dieser Säuren in Mischungen zeigt, wenn sie als N-Quellen gegeben werden (S. 303), wird man also einen dem Zucker vergleichbaren Ertragswert nur bei so niedrigen Konzentrationen erwarten dürfen, die im allgemeinen nicht mehr zu den maximal erzielbaren Erträgen ausreichen. Tabelle XVI zeigt, daß dies jedoch in gewissen Fällen, wie bei der stark „hemmenden“ bzw. „unbrauchbaren“ Milchsäure, der Fall sein kann, in diesem Falle also bei genügender Senkung der Konzentration der Wasserstoffionen.

Die Frage der Eignung einer organischen Säure als Kohlenstoffquelle ist also weitgehend eine Frage der Wirkung der Konzentration dieses Stoffes, was, abgesehen von der Bedeutung der Konzentration der Wasserstoffionen, viel stärker beachtet werden müßte als das im allgemeinen geschieht. Von einer solchen „innerphysiologischen“ Wirkung der Konzentration verschieden wäre offenbar eine Konzentrationswirkung, die in mehr äußerlichem Sinne dadurch zustande kommen könnte, daß bei steigender Konzentration der als Alkali gebotenen Säure eine immer mehr steigende Alkalisierung des Mediums und daraus erfolgende Hemmung zu erwarten wäre. Für den in Tabelle VI angeführten Fall der Essigsäure gilt das jedenfalls nicht: Denn bei 5 % Natriumacetat erfolgte keine Verarbeitung mehr, was aber hier, wie die  $p_{\text{H}}$ -Werte zeigen, nichts mit einer Alkalisierung zu tun hat. Wie weit dieser Faktor zur innerphysiologischen Wirkung der Konzentration hinzukommt, wäre im einzelnen noch näher zu ermitteln.

Was die geprüften Aminosäuren betrifft, so zeigt sich bei dem am schlechtesten verwertbaren Leucin ebenfalls eine erheblich bessere Wirkung bei weniger saurer Reaktion (Tabelle XIII). Man kann daraus wohl den Schluß ziehen, daß die hemmende Wirkung der Aminosäuren, soweit sie bei höherer Konzentration hervortritt (Tabellen IX und XI) oder soweit es sich um schlecht bzw. nicht verwertbare Aminosäuren handelt, auf die Entstehung saurer Abbauprodukte zurückzuführen ist, deren Natur im einzelnen noch festzustellen wäre. Damit steht die

oben S. 291 ff. festgestellte Tatsache in Einklang, daß die Desaminierung der Aminosäure der Verarbeitung des Stickstoffs weit vorausseilt.

So ergibt sich hinsichtlich der Stickstoffernährung ein sehr einheitliches, zu dem der Kohlenstoffernährung passendes Bild. Es sei aber nochmals darauf hingewiesen, daß diese „Säurewirkung“ nicht unmittelbar eine Wirkung der Wasserstoffionen darstellt, sondern offenbar des ganzen Säuremoleküls, dessen Wirkung, wie ebenfalls bereits ausgeführt wurde (S. 304), für jede Säure verschieden ist, da sich die „Giftwirkungen“ keineswegs summieren. Für die Ammoniaksalze der starken organischen Säuren ergab sich hingegen offenbar eine reine Wirkung der frei werdenden Wasserstoffionen, daher eine einheitliche Wirkung.

Ob die schädliche Wirkung höherer Konzentrationen von Zucker, wie Glucose, ebenfalls durch Säurewirkung erklärt werden kann, ist nicht ohne weiteres zu sagen. Jedenfalls werden organische Säuren nicht in großem Umfange aus Zucker gebildet, wie der Verlauf der  $p\text{H}$ -Werte z. B. in Tabelle VIII zeigt. Es müßte sich also um eine in geringerer Menge wirksame Säure handeln oder um ein anderes Produkt des Intermediärstoffwechsels, das die Hemmung verursacht. Denn wie oben S. 287 ausgeführt wird, können wir unsere frühere Ansicht über die Ablenkung von der Desaminierung des Glykokolls nicht mehr, wenigstens nicht mehr in vollem Umfange, aufrechterhalten. Natürlich ist auch möglich, daß eine Konzentrationswirkung unmittelbarer Art, also nicht über den Abbau, ausgeübt wird.

Was für die Glucose gilt, gilt auch für die anderen geprüften Kohlenstoffquellen, z. B. für die Lävulose. Hier liegen die Verhältnisse offenbar ähnlich wie bei den organischen Säuren, insofern als nach Tabelle II auch hier die Wirkung der schlechteren Kohlenstoffquelle sich bei geringerer Konzentration der der besseren angleicht. Es bleibt aber auch hier zunächst unklar, ob die hemmende Wirkung der höheren Konzentration eine unmittelbare ist oder die Wirkung eines Intermediärproduktes. Für diese letztergenannte Möglichkeit spricht indessen die Tatsache, daß von der schädlichen Zuckerkonzentration eine gewisse Menge verarbeitet wird; ihre Konzentration wird also gesenkt, und es würde so die Möglichkeit zu einer weiteren Verarbeitung geschaffen. Die gleiche Betrachtung würde übrigens auch für die Glucose gelten und ebenso für die organischen Säuren (vgl. z. B. Tabelle V) und Aminosäuren. Ein allgemein gültiger Schluß läßt sich jedenfalls aus unseren Versuchen noch nicht ziehen.

Schließlich sei hier noch auf eine Folgerung hingewiesen, die sich aus unseren Versuchen für die Bakteriensystematik ergibt. Es ist durchaus problematisch, wie weit physiologische Eigenschaft zur systematischen Unterscheidung von Bakterien herangezogen werden dürfen (vgl. *Rippel*

und *Pietschmann*). Unsere Versuche zeigen das weiter sehr deutlich. Die Verarbeitung von organischen Säuren, Aminosäuren, Zuckern und sonstigen Kohlenstoffquellen hängt so stark von der Konzentration des Stoffes, von der Konzentration der Wasserstoffionen und sonstigen (hier nicht geprüften) Bedingungen ab, daß eine systematische Verwertbarkeit äußerst fraglich erscheint; dazu kommt noch die Veränderlichkeit gewisser Eigenschaften. Obwohl diese Dinge wiederholt ausgesprochen wurden, werden sie vielfach doch nicht genügend beachtet. Und unsere Versuche haben weiterhin noch gezeigt, daß die Unterschiede oft nur quantitativer Natur sind. Es ist aber oft nicht möglich, qualitativ die bessere oder schlechtere Eignung einer Kohlenstoffquelle abzuschätzen. Es wird also erwünscht sein, künftighin mehr quantitative Versuche durchzuführen als das bisher üblich war, gerade bei Versuchen mit Bakterien.

### Zusammenfassung.

*B. glycinophilus* vermag bei Glykokoll als Stickstoffquelle und einer Hexose als C-Quelle nur aus Glucose kräftig Eiweiß zu bilden. Lävulose, Mannose und Galactose sind schlecht geeignet, ebenso Xylose und Arabinose. Rohrzucker und Maltose werden ebenfalls gut, Lactose schlecht verarbeitet. Gute Kohlenstoffquellen sind auch Glycerin, Mannit und Äthylalkohol. Rohrzucker wird indessen nicht besser verarbeitet als den Anteilen der beiden Hexosen entspricht.

Von organischen Säuren als einziger Kohlenstoffquelle wird Essigsäure in 0,5 %iger Konzentration weitaus am besten verwertet, noch bis in den schwach sauren Bereich, während Buttersäure nur bei schwach alkalischer Reaktion, dann aber gut, verwertet wird. Schlecht geeignet sind Ameisen-, Äpfel-, Bernstein-, Glycol-, Milch-, Oxal- und Weinsäure, so gut wie ungeeignet Citronen- und Glyoxylsäure, auch bei schwach alkalischer Reaktion.

Hinsichtlich der Stickstoffernährung ergibt sich bei den Ammoniaksalzen organischer Säuren ein ähnliches Bild, nur ist die Eignung etwas besser als den Verhältnissen bei Darbietung der Säuren als einziger Kohlenstoffquelle entspricht. Aber nur Ammoniumacetat kam restlos zur Wirkung.

Harnstoff und Nitrat werden nicht verwertet.

Alanin ist eine etwas schlechtere Stickstoffquelle als Glykokoll, Leucin wirkt erheblich schlechter; doch steigt die Wirkung mit abnehmender Konzentration der Wasserstoffionen, wohl infolge verminderter Wirkung saurer Abbauprodukte. Auch bei schlechter Wirkung wird Leucin von den lebenden Zellen desaminiert, so daß die Verarbeitung der Aminosäuren wohl über die Desaminierung geht.

In anteilmäßigen Mischungen werden Ammoniaksalze besser verwertet als nach der Wirkung der Einzelsalze zu erwarten ist; ein gleiches ist der Fall für Glykokoll und Alanin. Hierbei dürfte die Verringerung der Einzelbestandteile der Mischung, also ihre Konzentrationssenkung,

die wesentlichste Ursache sein. Auf die Folgerung für die Frage der besseren Eignung von Aminosäuren in Mischung wird hingewiesen.

*B. glycinophilus* lässt sich in größeren Lüftungsgefäßen bei außerordentlich hohem ökonomischem Koeffizienten züchten.

Es wird darauf hingewiesen, daß, mehr als bisher üblich war, quantitative und bei verschiedener Konzentration der C-Quelle durchgeführte Versuche die Eignung oder Nichteignung einer Kohlenstoffquelle erweisen müssen.

Dem „Forschungsdienst“ sei für die Bereitstellung von Mitteln zur Durchführung unserer Arbeiten bestens gedankt.

### Literatur.

*Ayers, S. H.*, *Ph. Rupp u. Wm. T. Johnson*, U. S. A. Dept. Agr. Bull. **782**, 1, 1919. — *Bach, D.*, C. R. Acad. Sc. Paris **179**, 1085, 1924. — *Becker, Z. E.*, *Protoplasma* **25**, 161, 1936. — *Bortels, H.*, Centralbl. f. Bakt. II, **102**, 129, 1940. — *Braun, H.* und Mitarbeiter, *Biochem. Zeitschr.* **131**, 226, 272, 1922; **145**, 381, 1924; Centralbl. f. Bakt. I, Orig. **107**, 35, 1928. — *Bredemann, G.*, Centralbl. f. Bakt. II, **86**, 353, 1932. — *Bredemann, G.*, u. *W. Werner*, ebenda **86**, 479, 1932. — *Buchanan, R. E.*, u. *E. J. Fulmer*, *Physiology and Biochemistry of Bacteria*. London, Baillière, Tindall u. Cox., 1930. — *Cohen, B.*, u. *W. M. Clark*, J. Bacteriol. **4**, 409, 1919. — *den Dooren de Jong, L. E.*, *Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieprocess*. Rotterdam, Nijgh u. van Ditmar, 1926. — *Egami, F.*, Bull. Soc. Chim. Biol. Paris **20**, 301, 1938. — *Franke, W.*, u. *W. Peris*, Biochem. Zeitschr. **295**, 61, 1937. — *Franke, W.*, u. *B. Banerjee*, ebenda **305**, 57, 1940. — *Janke, A.*, u. *W. Tayenthal*, ebenda **289**, 76, 1936. — *Kluyver, A. J.*, *H. G. L. Donker* u. *F. Visser*, ebenda **161**, 361, 1925. — *Krehan, M.*, diese Zeitschr. **1**, 493, 1930. — *Maassen, A.*, Arb. Kaiserl. Ges.-Amt **12**, 340, 1896. — *Nilsson, R.*, diese Zeitschr. **12**, 63, 1941. — *Nord, F. F.* in: *F. F. Nord* u. *R. Weidenhagen*, *Handb. d. Enzymologie*, Bd. 2, S. 993ff. Leipzig, Verlagsges. Becker u. Erler, 1940. — *Rippel, A.*, diese Zeitschr. **8**, 41, 1937. — *Rippel, A.*, *G. Behr* u. *K. Nabel*, ebenda **9**, 375, 1938. — *Rippel, A.*, u. *K. Nabel*, ebenda **10**, 359, 1939. — *Rippel, A.*, u. *K. Pietschmann*, Nachr. Akad. d. Wiss. Göttingen, Math.-Physik. Kl., 1941, S. 119. — *Ruschmann, G.*, u. *W. Meyer*, diese Zeitschr. **5**, 477, 1934. — *Uppal, B. N.*, J. Agr. Res. **32**, 1009, 1926. — *Werner, W.*, Centralbl. f. Bakt. II, **87**, 446, 1932/33. — *Winslow, C. E. A.*, u. *E. E. Lochridge*, J. Inf. Dis. **3**, 547, 1906. — *Zinkernagel, A.*, Centralbl. f. Bakt. II, **78**, 191, 1929.

(Aus der Biologischen Abteilung des Institutes für Biochemie und Nahrungs-  
mittelchemie der deutschen technischen Hochschule in Prag.)

## Weitere Beiträge über Verbreitung und Leben mikroskopischer Bodenpilze.

Von

A. Niethammer.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. August 1941.)

### 1. Begründung der Untersuchungen sowie Arbeitsgang.

Frühere Arbeiten hatten bereits auf die Fülle von Pilzformen im Erdreich hingewiesen [Niethammer (1)]. Studien und Beobachtungen in pflanzengeographischer Hinsicht zeigen, daß man nur durch viele Untersuchungen in den mannigfachsten Gebieten zu einem abgeschlossenen Bild kommen kann. Viele der gelegentlich isolierten Pilzformen sind noch wenig bekannt; ihre Entwicklungsart, Variationsbreite, ihre Leistungen und besondere Eigentümlichkeiten sind zu verfolgen.

Unsere Aufgabe hier ist es, über die mikroskopischen Bodenpilze verschiedener Gebiete des großdeutschen Raumes zu berichten und deren Lebensbedingungen zu erforschen. Gelegentlich wird auch im Anschluß an frühere Beobachtungen [Niethammer (2)] die mikroskopische Pilzflora von Früchten sowie Samen der Pflanzen, welche der untersuchte Boden trägt, geprüft.

Die Bodenproben wurden mit Hilfe eines Pflanzenstechers etwa 5 cm tief aus dem Erdreich entnommen und sofort in sterile Gläserchen überführt. Bei der Überprüfung von Geröllen und Gesteinen konnte nicht so tief gegangen werden. Jeweils 2 g der zu untersuchenden Erdprobe wurden mit 20 ccm sterilen Wassers aufgenommen und davon einige Tropfen auf die Nährmedien gebracht. Die Rohkulturen wurden auf Bierwürze-Agarplatten bei einer Temperatur von 20 bis 22° gewonnen. Zur Bereitung dieses Nährbodens diente Bierwürze von 4° Balling mit einem 2%igen Zusatz von Agar-Agar. Zur Reinzucht und Beobachtung gehören besondere Nährmedien, für deren Auswahl die Gattung oder Art des Pilzes maßgebend ist. Aus diesem Grunde ist die Zusammensetzung der Nährmedien bei der Beschreibung der Gattungen angeführt. Die Proben wurden in den Jahren 1939, 1940 und 1941 jeweils in den Monaten April bis Juli gezogen.

### 2. Angabe der Fundstellen und Zusammenstellung der Pilzgruppen.

Die Pilzarten werden hier summarisch aufgezählt; die genaue Bezeichnung mit dem Autorennamen sowie nähtere Behandlung erfolgt in dem anschließenden dritten Abschnitt.

Mehrere Untersuchungen wurden im Gebiete von Maria-Zell in der nordöstlichen Steiermark durchgeführt. Im Anschluß an unsere Studien weisen wir auf die Arbeit *Szilvinyi* hin, die das benachbarte Gebiet von Lunz zum Gegenstand hat.

#### *Unkultivierte Gebiete.*

1. Kalkgerölle, Kalkgruß, Kalksand in den Oetschergräben: *Mucor hiemalis*, *Penicillium expansum*, *Penicillium elegans*, *Trichoderma Koningi*, *Macrosporium commune*, *Verticillium chlamydosporum*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium solani*. 2. Kalkgestein, Kalkgruß, Kalksand unweit Gußwerk: *Mucor hiemalis*, *Aspergillus glaucus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium bicolor*, *Dematium pullulans*. 3. Eisenhaltige, rote Erde über Kalkgestein; Oetschergräben: *Penicillium glabrum*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum*, *Dematium pullulans*. 4. Eisenhaltige Erde Bürgeralm: *P. expansum*, *P. luteum*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium solani*. 5. Eisenhaltige rote Erde über Kalkgestein, Gnadenwald: *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum*, *Dematium pullulans*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium orthoceras*. 6. Erde unter Moospolstern in der Salzaklamm: *Mucor silvaticus*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma Koningi*, *Dematium pullulans*, *Fusarium oxysporum*. 7. Boden unter einem dichten Bestande von *Geranium sanguineum*: *Penicillium notatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium luteum*, *Trichoderma Koningi*, *Verticillium chlamydosporum*, *Alternaria tenuis*, *Dematium pullulans*, *Arthrobotrys arthrobotryoides*. Von dem gleichen Standorte wurden nicht völlig ausgereifte Früchte mitgenommen. An den unter sterilen Bedingungen isolierten Samen ist *Arthrobotrys arthrobotryoides* sowie *Alternaria tenuis* zu erkennen. 8. Erdreich unter Stauden von Heidelbeeren: *Arthrobotrys arthrobotryoides*, *Penicillium luteum*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium orthoceras*. *Arthrobotrys arthrobotryoides* sowie *Botrytis cinerea* wurden auch an der Frucht steril entnommenen Samens erkannt, ebenso entwickelten sich die beiden Pilze aus dem Saft der Früchte.

#### *Weideflächen.*

9. Kökensattel, sehr abgelegen, wenig von Menschen betreten: *Penicillium bicolor*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma Koningi*, *Dematium pullulans*, *Arthrobotrys arthrobotryoides*, *Torula pulcherrima*, *Fusarium scirpi*. 10. Bürgeralm, 900 bis 1000 m Höhe: *Mucor hiemalis*, *Penicillium commune*, *Penicillium luteum*, *Penicillium glaber*, *Dematium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium orthoceras*. 11. Weide- bzw. Wiesenflächen unweit der Salza: *Mucor hiemalis*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Dematium pullulans*, *Fusarium orthoceras*. 12. Weideland über roter Erde, Gemeindealm, etwa 1400 m Höhe: *Zygorhynchus Moelleri*, *Penicillium luteum*, *Penicillium expansum*, *Verticillium chlamydosporum*, *Dematium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium orthoceras*, *Fusarium scirpi acuminatum*.

#### *Gehölz- bzw. Waldbestand.*

13. Erdreich unter Haselnußhecken: *Mucor racemosus*, *Aspergillus glaucus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium bicolor*, *Botrytis cinerea*, *Dematium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria tenuis*, *Trichoderma Koningi*, *Verticillium ruberrinum*, *Arthrobotrys arthrobotryoides*, *Fusarium*

*solani*. Den Früchten der Haselnußstauden dieses Standortes werden unter sterilen Bedingungen die Kerne entnommen. *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea* sowie *Arthrobotrys arthrobotryoides* werden erkannt. Nüsse, die wir in Tetschen-Liebwerd sammelten, wiesen den gleichen Pilzbefall auf. 14. Fichten auf dem Abhange der Bürgeralm: *Trichoderma Koningi*, *Torula pulcherrima*, *Mucor hiemalis*.

#### Ackerflächen.

15. Kartoffelfeld: *Mucor hiemalis*, *Penicillium suavolens*, *Penicillium luteum*, *Penicillium elegans*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus glaucus*, *Dematioides pullulans*, *Torula pulcherrima*, *Cladosporium herbarum*, *Scopulariopsis brevicaule*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium solani* var. *Martii*. 16. Roggenfeld: *Penicillium expansum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium luteum*, *Aspergillus glaucus*, *Dematioides pullulans*, *Cladosporium herbarum*. *Fusarium orthoceras*, *Cladosporium herbarum* sowie *Dematioides pullulans* bilden auf den Spelzen der Ähren schwarze Überzüge. 17. Haferfeld: *Penicillium luteum*, *Cladosporium herbarum*, *Dematioides pullulans*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma Koningi*. Die beiden erwähnten Schwärzepilze bilden auf den Spelzen der Bestandspflanzen dunkle Flecke.

Von einem großen Ackerschlage, der mit Luzerne bestanden war, schickte uns die Gutsverwaltung des Limburger-Hofes in der Rheinpfalz mehrere Erdproben. Das Stück war vor einigen Jahren mit Schwefelblüte behandelt worden und es interessierte die Zusammensetzung der mikroskopischen Pilze.

1. Schlag: *Mucor racemosus*, *Penicillium luteum*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma Koningi*, *Alternaria tenuis*, *Fusarium orthoceras*, *Fusarium bulbigenum*. Daneben sind große Mengen von *Bacillus subtilis* zu erwähnen. 2. Schlag: *Mucor hiemalis*, *Penicillium expansum*, *Penicillium luteum*, *Cladosporium herbarum*. Auffallend starke Mengen an *Bacillus subtilis*. 3. Schlag: *Mucor racemosus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium bicolor*, *Botrytis cinerea*, mit sehr vielen, großen, sterilen Sklerotien, *Dematioides pullulans*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium dimerum*. 4. Schlag: *Mucor hiemalis*, *Penicillium notatum*, *Fusarium orthoceras*. 5. Schlag: *Penicillium notatum*, *Penicillium luteum*, *Trichoderma Koningi*, *Dematioides pullulans*, *Fusarium dimerum*. 6. Schlag: *Penicillium notatum*, *Penicillium luteum*, *Dematioides pullulans*, *Fusarium orthoceras*. Sehr viel *Actinomyces odorifer* und *Bacillus subtilis*, die aber in der Rohkultur stets streng gesondert von den Pilzen wachsen. 7. Schlag: *Penicillium expansum*, *Penicillium notatum*, *Dematioides pullulans*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium sporotrichoides*, sehr viel *Actinomyces odorifer*. 8. Schlag: *Mucor silvaticus*, *Mucor racemosus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium bicolor*, *Dematioides pullulans* (*drigula*), *Trichoderma Koningi*, *Fusarium bulbigenum*. Viel *Bacterium vulgare*, *Bacillus subtilis* und Kokken.

Das Untersuchungsergebnis zeigt in diesen Schlägen eine sehr reiche Mikroflora.

In landwirtschaftlich kultiviertem Gebiete bei Oschatz in Sachsen wurden einige Proben gezogen.

1. Kartoffelfeld: *Zygorhynchus Moelleri*, *Penicillium luteum*, *Dematioides pullulans*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium solani* var. *Martii*. 2. Gerstenfeld: *Penicillium bicolor*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium bulbigenum*. 3. Roggenfeld: *Mucor racemosus*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium solani*.

4. Weidefläche: *Penicillium bicolor*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium solani* var. *Martii*.

Eine Probe wurde unweit Dresden am Elbeufer gezogen: *Zygorhynchus Moelleri*, *Penicillium notatum*, *Fusarium orthoceras*. Im Elbetal unweit Tetschen wurden unter Obstbäumen zwei Proben gezogen.

1. Erdreich unter Apfelbäumen: *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium expansum*, *Dematiu pullulans*. Die gleichen Pilze wurden in Früchten, die diesem Standort entnommen wurden, gefunden.

2. Erdreich unter Birnenbäumen: *Penicillium expansum*, *Penicillium bicolor*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*. In dem Kerngehäuse von Birnen, welche diesem Standort entstammten, fanden wir *Penicillium expansum* sowie *Cladosporium herbarum*. Ferner sehr viele *Hefen*, welche im Boden fehlten.

Im Gebiete von Böhmen wurde das Erdreich verschiedener Waldungen geprüft.

1. Böhmisches Brod, vorwiegend Fichten: *Mucor silvaticus*, *Penicillium luteum*, *Fusarium orthoceras*. 2. Popowitz-Königshof, Fichtenbestand: *Mucor hiemalis*, *Penicillium notatum*, *Fusarium solani*. 3. Beraun, Fichten- und Birkenbestand: *Zygorhynchus Moelleri*, *Mucor racemosus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium suaveolens*, *Penicillium bicolor*, *Aspergillus glaucus*, *Trichoderma Koningi*, *Dematiu pullulans*, *Fusarium solani*, *Fusarium avenaceum*. Ferner ist auf sehr viel *Actinomyces odorifer*, *B. singularis*, gelb mit einem blauen Rande, sowie *Micrococcus candidus* Fligge und *B. subtilis* hinzuweisen. 4. Kladno, Fichtenbestand: *Mucor hiemalis*, *Absidia spinosa*, *Penicillium luteum*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma Koningi*, *Dematiu pullulans*, *Fusarium solani*. 5. Bažantice bei Kladno, Fichten und Kiefern: *Mucor hiemalis*, *Penicillium bicolor*, *Trichoderma Koningi*, *Fusarium di-merum*. 6. Radeschowitz, Fichten und Tannen: *Absidia spinosa*, *Penicillium notatum*, *Penicillium bicolor*, *Verticillium chlamydosporum*, *Trichoderma Koningi*, *Cladosporium herbarum*, *Dematiu pullulans*, *Fusarium orthoceras*, *Torula pulcherrima*. In sehr großer Menge ist *Actinomyces odorifer* vorhanden.

Die Zusammenstellung zeigt, daß bestimmte Arten von Pilzen isoliert wurden, die an den *verschiedensten* Standorten wiederkehren. Man erkennt wieder das Vorhandensein *typischer* Bodenpilze, welche nicht unbedingt mit dem Standort oder der Bestandsflora zusammenhängen. Einige Eigentümlichkeiten können hier festgehalten werden. Vertreter der Gattung *Penicillium* treten gerne in verschiedenen Formen miteinander auf; meist ist ein Vertreter der Gruppe *Asymmetricum* mit einem solchen der Gruppe *Symmetricum* vereinigt. *Trichoderma Koningi* ist ein sehr verbreiterter Bodenpilz. Bei der Verfolgung des Wachstums in den Rohkulturen ist manche Besonderheit zu verzeichnen. Die Stämme der Gattung *Fusarium* sind meist innig mit einem Vertreter einer anderen Pilzart vereinigt. Die Trennung der beiden Pilze ist gewöhnlich recht schwierig. Häufig ist hier eine Vergesellschaftung mit einem *Mucor* oder einem *Zygorhynchus*. Das *Fusarium*, welche Art auch immer, wächst meist in das Substrat hinein. Hier werden breite, mit hyalinen oder gelben Öltropfen erfüllte Hyphen gebildet. Mit

fortschreitender Kulturdauer dunkeln diese Öleinschlüsse sehr stark nach. Darüber entwickelt sich ein teils eingesenktes, zum größeren Teil aber der Luft zustrebendes Mycel von einem *Mucor*. Auch der Vertreter der Gattung *Mucor* entwickelt unter diesen Bedingungen reichlich Gemmen, Chlamydosporen sowie Riesenzellen, welche alle viele Öltropfen enthalten (vgl. die nun folgende Beschreibung der Pilze). Unterbleibt eine Vergesellschaftung mit der Gattung *Mucor*, so ist ein Zusammenwachsen mit *Trichoderma*, *Penicillium* oder *Cladosporium* zu verfolgen. Von den Vertretern dieser Pilzgattungen wird das *Fusarium* meist in seinem Wachstum stark zurückgedrängt. Vertreter der Gattung *Penicillium* verdrängen gerne auch andere Pilzgattungen, so vor allem *Cladosporium* und *Dematioides*. Auf angefeuchteten Cellulosestreifen ist diese Erscheinung sehr deutlich zu verfolgen. *Trichoderma Konigii* überwuchert mit ihren wolligen Decken sehr gern die anderen Pilzarten. In den Rohkulturen fällt auch die deutliche Abgrenzung von *Pilzen* und *Bakterien* gegeneinander auf. Die Bakterienkolonien entstehen immer selbstständig und dulden neben und über sich keine Pilze.

Die frisch aus dem Erdreich gezüchteten Stämme der Gattung *Mucor* neigen zur Bildung von *Zygoten*, längere Kulturdauer lässt diese Eigenschaft wieder verlorengehen. Die Stämme der Gattung *Penicillium* lassen sehr reichliche Mengen an sterilen und gelegentlich auch fertilen Sklerotien erkennen. *Dematioides pullulans* schritt desgleichen zur Bildung von Perithecien.

### 3. Beschreibung wichtiger Pilzarten und Berücksichtigung ihrer Leistungen.

Frisch dem Erdreich entnommene Stämme zeigen oft bestimmte Eigentümlichkeiten. Gelegentlich haben verschiedene Stämme einer Art ein ungleiches Verhalten. Die Besprechung der isolierten Stämme erfolgt nach Familien geordnet.

#### *Familie Mucoraceae.*

Gattung *Mucor*. Als Kulturmedien kommen angefeuchtete Brotbrösel, Bierwürzeagar sowie 5 %ige Lösungen von Glucose oder Saccharose in Frage. Die Zuckerlösungen erhalten 1 % Ammonsulfat und je 0,1 % saures Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat.

*Mucor hiemalis* Wehmer. Je nach Rasse auf Brot weiß, gelb oder grau getönt. Die dem Waldboden entstammenden Formen sind meist grau, die aus dem Ackerland kommenden gelb getönt. Ein kleiner Kragenrest an der Kolumella ist typisch. Auf Bierwürzeagar sind die unregelmäßig gestalteten, etwa 14  $\mu$  langen und 2—5  $\mu$  breiten Sporen charakteristisch; sie können länglich, nieren- oder eiförmig sein, meist

weisen sie einen grünlichen Anflug auf. In Kulturen auf Bierwürzeagar sind Chlamydosporen, Gemmen und Riesenzellen mit Öltropfen zu erwähnen. Zunehmende Kulturdauer steigert diese Ölspeicherung deutlich. Die erst hellen bis grauen Öltropfen erleiden allmählig eine gelbe Verfärbung. Eine besonders kräftige Bildung von Riesenzellen, zahllosen Gemmen und Kugelzellen tritt bei dem Beisammensein mit *Fusarien*, vor allem *F. orthoceras*, ein; dies gilt für Bierwürzeagar. Zycha erwähnt die Möglichkeit der Bildung von Riesenzellen und Gemmen, beschreibt sie aber nie in einem solchen Ausmaße, wie wir sie hier erkannten. Diese Beobachtungen ermittelten wir bei allen hier isolierten Stämmen. Überführt man die einzelnen Stämme in 5 %ige Lösungen von Glucose oder Saccharose, so tritt nur submerses Wachstum auf und die Bildung von Gemmen, Kugelzellen, Riesenzellen und damit die Speicherung von Öl wird sehr gesteigert. Manche Kulturen nehmen infolge der kräftigen Ölspeicherung eine gelbe Färbung an. Zygogenbildung glückte bei keinem der Stämme.

Nahe verwandt mit dieser Art ist *Mucor silvaticus* Hagen (Abb. 1). Auf Brotbröseln erscheinen grauschwarze Lager. Die Sporen sind regelmäßiger als bei *Mucor hiemalis*. Auf Bierwürzeagar ist eine ungewöhnlich starke Bildung von Riesenzellen mit großen Öltropfen zu verzeichnen; ferner ist auf Gemmen und Kugelzellen hinzuweisen. In der Rohkultur fördert die Vereinigung mit einem *Fusarium*, so beispielsweise mit *F. orthoceras*, diese Ausbildungsart. In 5 %igen Glucose- oder Saccharoselösungen entstehen Riesenzellen, deren Länge 100—200  $\mu$  und deren Breite 20—30  $\mu$  beträgt; sie sind dicht mit Öltropfen gefüllt. In dieser submersen Kultur verschwindet die normale Mycelbildung fast vollständig; an ihre Stelle treten neben den Riesenzellen Gemmen und Kugelzellen. An leiterförmigen Trägern tritt auf Bierwürzeagar die Bildung von erst hellen, dann dunkelgetönten Zygogen ein. Diese Fähigkeit, Zygogen zu bilden, geht in der Kultur sehr bald verloren.

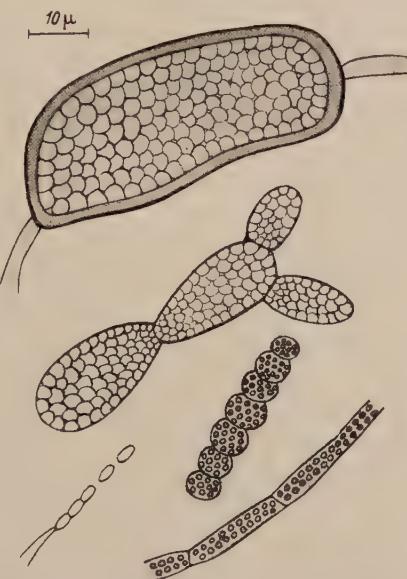


Abb. 1. *Mucor silvaticus*. Riesenzellen, Chlamydosporen, Hyphen mit starker Fettspieicherung, Oldien. Vergr. 800.

Cellulose kann dieser Pilz ebensowenig verwerten wie *M. hiemalis*. Auf Holzstoff tritt schwaches Wachstum ein. Ligninhaltige Ablaugen von Zellstofffabriken können von *M. silvaticus* in bescheidenem Ausmaße verwertet werden. Verwendet man die Laugen in konzentrierter Form (etwa 2 % Fehling reduzierende Substanzen), allerdings neutralisiert, so tritt nur submerses Wachstum ein. Das mikroskopische Bild zeigt Riesenzellen, Gemmen und Kugelzellen, alle mit sehr großen Öltropfen erfüllt. Normale Mycelbildung unterbleibt. Fügt man Wasser hinzu, so wird bis zu einem Gehalt von 60 % Wasserzusatz die Entwicklung gefördert, allerdings entstehen nur submersse Lager. Weiterer Wasserzusatz bedingt einen Rückschritt der Entwicklung. Fügt man stufenweise Bierwürze von 4° Balling zu, so wird das Wachstum deutlich gesteigert. 60 Teile der Ablauge und 40 Teile Bierwürze gestatten normales Wachstum, das submers mit darüberliegender Decke erfolgt. Alle isolierten Stämme zeigen ein übereinstimmendes Verhalten.

*Mucor racemosus* Fresenius. Die hier ermittelten Erfahrungen stimmen mit den Angaben von *Zycha* und unseren eigenen früheren Beobachtungen [Niethammer (1)] überein. Sehr starke Chlamydo- sporenbildung ist allen isolierten Stämmen eigen.

Gattung *Zygorhynchus*. Nährböden wie bei *Mucor*.

*Z. Moelleri* Vuillemin. Auf Bierwürzeagar die bekannten eingesenkten Lager (vgl. *Zycha*, *Niethammer*). Alle Stämme zeigen ein übereinstimmendes Bild. In 5 %igen Glucoselösungen submerses Wachstum. Riesenzellen und verbreiterte Hyphenstücke, ähnlich wie bei *M. silvaticus*, werden geformt. Die anfangs schwache Speicherung von Öltropfen nimmt mit zunehmender Kulturdauer zu; deutliche gelbe Verfärbung. Im mikroskopischen Bilde ist auf die dicken, gelben Öltropfen hinzuweisen. In 5 %igen Saccharoselösungen unterbleibt das Wachstum. Ablauge von Sulfitzellstoff (etwa 2 % Fehling reduzierende Stoffe) zur Hälfte mit Wasser verdünnt, erlaubt deutliche submersse Entwicklung mit starker Ölspeicherung; diese Beobachtung gilt nur für den aus dem Elbetal bei Dresden isolierten Stamm.

Aus der Gattung *Absidia* wurde nur *A. spinosa* van Tieghem isoliert. Diese Art ist an dem Sporn, in den die Kolumella nach oben ausläuft, leicht zu erkennen. Im übrigen gelten die Angaben von *Zycha* und *Niethammer*.

#### *Familie Aspergillaceae.*

Bei den beiden Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* ist der Czapek-Agar vorteilhaft. Seine Zusammensetzung ist: 3 g Natriumnitrat, 1 g saures Kaliumphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Kaliumchlorid, 0,01 g Eisenchlorid, 30 g Saccharose; mit destilliertem Wasser wird auf 1000 ccm aufgefüllt.

Die gelegentlich von *Aspergillus glaucus* Link isolierten Stämme weisen die typischen von Thom und Niethammer (1) beschriebenen Merkmale auf. In Bierwürzeagar ist das reichliche Vorkommen von Kalkoxalatausfällungen zu erwähnen.

Die Gattung *Penicillium* ist mit sehr vielen Stämmen vertreten.

Die mikroskopischen Merkmale werden auf dem vorhin erwähnten Czapek-Agar behandelt. Das Habitusbild ist auf Fleischagar nach *Sopp* zu verfolgen; dieser besteht aus je 1 g Pepton und Fleischextrakt, ferner 3 g Glycerin und 5 g Rohrzucker, mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Das Farbenspiel ist in der *Wöltje*-Lösung zu verfolgen. Diese enthält 1 % Asparagin, 7,5 % Saccharose, 0,5 % saures Kaliumphosphat, 0,25 % Magnesiumsulfat. Vertreter dieser Gattung besiedeln sehr gern Zellstoffstreifen, die mit einer nach *Stapps* Vorschriften zusammengesetzten Nährlösung angefeuchtet wurden (0,5 g Ammonsulfat, 0,25 g saures Kaliumphosphat, 0,1 g Magnesiumsulfat, mit Wasser auf 1000 ccm aufgießen).

Vertreter der Gruppe *Monoverticillium* sind spärlich vertreten. *Penicillium glabrum* Wehmer. Dünne, samtige Decken werden gebildet. Der Konidienträger weist eine leicht keulige Anschwellung auf, welche typisch ist. In 5 %igen Saccharoselösungen werden derbe, weiße Decken mit graugrünem Konidienlager gebildet. Cellulosestreifen lassen die Bildung grauer, geschlossener Decken zu.

Gruppe *Asymmetricum*. *Penicillium notatum* Westling. Der Konidienträger kann verschieden ausgebildet sein. In vielen Fällen sind verhältnismäßig kurze Rami vorhanden, welche die Sterigmen tragen. Bei manchen Stämmen beobachtet man ungewöhnlich lange Rami, die etwa 30—40  $\mu$  lang sind, auf ihnen sitzen die im Verhältnis sehr kurzen Sterigmen. Einzelne Stämme, so vom Kökensattel und Kalkgestein bei Gußwerk (Maria-Zell), weisen einen aus drei Stockwerken aufgebauten Konidienträger auf. Die gleichen Stämme führen in den Hyphen rundliche Einschlüsse, welche mit den normalen Fettreaktionen kein positives Ergebnis liefern. Neben den Hyphen fallen im Nährsubstrat kleine, viereckige Kristalle auf, die mikrochemisch als Calciumoxalat reagieren. Unter diesen Bedingungen sind die Hyphen bis zu 5  $\mu$  breit. Der Habitus der Kolonie auf *Sopp*-Agar ist stets samtig, das Wachstum kreisförmig, die Radien prägen sich deutlich ab. Die Konidiendecke auf *Wöltje* erscheint blaugrün, die Unterseite der Kultur gelb. Der Stamm von Schlag 4 des Limburger-Hofes bildet auf *Sopp*-Agar nach einer Kulturdauer von 14 Tagen weiße Sklerotien, welche steril bleiben. Ähnliche Sklerotien formt der Stamm aus Radeschowitz (Böhmen), aber nur auf den Erdstückchen des eigenen Bodens. Vereinzelt kommt es hier zur Bildung von achtsporigen Ascis. Auf 5 %igen Glucose- oder Saccharoselösungen entwickeln sich nur blaugrüne Inseln. Cellulosestreifen werden von allen Stämmen sehr gern besiedelt. Es werden weiche, samtige Decken gebildet. Die Stämme

aus Schlag 4, 6, 7 des Limburger-Hofes weisen besonders kräftige Entwicklung auf.

Bei dem Stamm aus Schlag 6 Limburger-Hof konnten wir feststellen, daß er eine ungewöhnlich gute Entwicklung in Ablaugen von Sulfit-zellstoff nimmt. Nicht nur Mycel-, sondern auch Konidienbildung konnte festgestellt werden. Kräftige Schleimbildung ist festzuhalten. Von allen anderen Stämmen zeigte nur der von Schlag 4 Limburger-Hof eine schwache Entwicklung.

*Penicillium suaveolens* Biourge. Bei dem typisch asymmetrisch ausgebildeten Konidienträger schwanken Zahl und Anordnung der einzelnen Glieder so stark, daß sie nicht zur exakten Bestimmung dienen können. Typisch ist die derbe und eckige Ausbildungsart. Das Habitusbild auf *Sopp*-Agar erleichtert die Bestimmung. Hier wird eine blau-grüne Decke geformt, welche aus vielen zusammenhängenden polygonartigen Ogiven geformt wird. In *Wöltje*-Lösung ist die blau-grüne Konidiendecke und das cremefarbene Mycel festzuhalten. Auf Cellulosestreifen werden dichte blau-grüne Decken gebildet. Haselnußschalen, die Becher der Nüsse sowie Sägespäne werden sehr gerne besiedelt.

*Penicillium commune* Thom. Der derbe, eckige asymmetrische Konidienträger gibt wenig Anhaltspunkte. Typisch ist wieder das Wachstumsbild auf *Sopp*-Agar, welches wollig ist. Die hier isolierten Stämme fallen durch einen eigenartig stechenden Geruch auf.

*Penicillium expansum* Thom. Diese oft isolierte Form ist leicht zu erkennen, obgleich die einzelnen Stämme manche Abweichungen zeigen. Der asymmetrische Konidienträger gibt wenig Anhaltspunkte. Typisch ist auf *Sopp*-Agar das Wachstumsbild, welches sich stets in regelmäßigen, konzentrischen Kreisen darbietet. Diese Kreise bestehen aus einzelnen, immer deutlich voneinander getrennten Bündeln. Diese Bündel setzen sich oft aus Koremien mit deutlichem weißen Fuß zusammen, wie dies bei dem Stamm aus dem Erdreich unter Apfelbäumen und den dazugehörigen Früchten der Fall ist. Der Stamm von der Bürgeralm (Maria-Zell) zeigte deutlich federartige Koremien. Braune Koremien zeigt der Stamm aus Gnadenwald (Maria-Zell). Das Farbenspiel in *Wöltje*-Lösung weist blau-grüne Konidiendecken und eine typisch braune Unterseite auf. In 5%igen Glucose- und Saccharoselösungen ist das Wachstum schwach, es werden nur blau-grüne Inseln gebildet. Cellulosestreifen werden sehr gerne besiedelt, hier werden nur Koremien gebildet, die reihenweise nebeneinander angeordnet sind. Der Stamm von Schlag 8, Limburger-Hof, bildet hier regelmäßige konzentrische Ringe. Diese Anordnung in Form einzelner Bündel ist ein sicheres Unterscheidungsmerkmal gegenüber *Penicillium notatum*. Diese Form vermag mit allen ihren Stämmen auf angefeuchteten Dörrpflaumen gut zu gedeihen. In vereinzelten Fällen ist Sklerotienbildung zu erkennen;

so bildet der Stamm aus einem Kartoffelfeld bei Maria-Zell auf Cellulosestreifen gelbliche, sterile Sklerotien.

Nun sind die Vertreter der Gruppe *Symmetricum* zu behandeln. Der die Konidien absondernde Apparat ist nicht nur regelmäßig gebaut, sondern auch viel zarter gestaltet, als dies bei den Vertretern der Gruppe *Asymmetricum* der Fall ist.

*Penicillium luteum* Zukal ist mit vielen Stämmen im Erdreich vertreten. Im mikroskopischen Bilde fallen auf *Czapek*-Agar die feinen aus drei Rami und je drei bis vier Sterigmen bestehenden Konidienträger auf. In einzelnen Fällen sind unterhalb der Rami noch Ramuli, welche eine asymmetrische Verzweigung aufweisen. Dies trifft bei dem Stamm, der den Weideflächen bei der Salzaklamm angehörte, zu. Der Stamm aus Walderde bei Kladno fiel im mikroskopischen Bilde durch die vielen nebeneinander angeordneten Konidienträger auf. Auf *Sopp*-Agar sind leichte, samtige Decken zu erwähnen. Im Farbenspiel auf *Wöltje*-Lösung sind die gelben Hyphen und ebensolche Abscheidungen typisch. Rote Farben fehlen. Mit fortschreitender Kultur bilden die meisten Stämme in großer Menge gelbe Sklerotien, welche steril bleiben. Der Stamm aus Erdreich unter Heidelbeeren lässt auf *Sopp*-Agar rosa Sklerotien entstehen. Ein Stamm aus roter Erde von der Bürgeralm zeigt keine Sklerotien. Auf 5%igen Glucoselösungen schwefelgelbe Decken, in derselben werden in Form kleiner, deutlich abgesetzter Kreise die dunkelgrünen Konidien abgesondert. In 5%igen Saccharoselösungen ebenfalls gelbes Mycel, aber glatte, dunkle Konidiendecke. Die Hyphen bilden deutliche Schleimmengen. Über dieser Decke entsteht allmählig ein rosa sklerotiales Mycel, in welchem sich einzelne rosa Sklerotien bilden. Diese Beobachtungen gelten für alle Stämme. Auf Cellulosestreifen tritt rasch gutes Wachstum ein. Das Mycel durchzieht das Nährsubstrat und lässt oberflächlich dicht aneinander gereihte gelbe Sklerotien entstehen. Die Konidienbildung ist meist unterdrückt. Es konnten aber auch Ausnahmen beobachtet werden. Der Stamm aus Schlag 5 des Limburger-Hofes bildet hier eine dichte Decke mit einem tiefgrünen Konidienrasen. Ein Stamm aus einem Kartoffelfeld in Maria-Zell zeigt das gleiche Verhalten; er gedeiht sehr gut auf Holzschliff und auch auf Holzwolle. Eine richtige Zersetzung und Aufweichung der Cellulose tritt selten ein. Ein Stamm aus Schlag 6 des Limburger-Hofes bedingt eine Erweichung der Substanz und ihre deutliche gelbe Verfärbung. Zu diesem Pilz ist als eine eigene Wuchsform *Penicillium bicolor* Fries zu stellen. Die Pilzmasse ist hier in Koremien mit gelbem Fuß und grünem Hut aufgelöst. Dieses Wachstumsbild erscheint bei allen Stämmen und ist auf Cellulosestreifen sehr gut zu erkennen. Überimpft man auf 5%ige Glucose- oder Saccharoselösungen, so erschienen geschlossene Decken mit grünen Konidienmassen, die an

die Stammform erinnern. Einzelne Stämme bilden Sklerotien. Der Stamm aus Waldbeständen bei Beraun (Böhmen) bildet gelbe Sklerotien; der Stamm von Schlag 6 des Limburger-Hofes zeigt nach 14-tägiger Kulturdauer neben gelben auch weiße Sklerotien. Der Stamm aus dem Kalkgestein von Gußwerk bildet rosa Sklerotien. Auch hier interessierte die Wachstumsmöglichkeit auf Ablaugen von Zellstofffabriken. *Penicillium luteum* stellte drei Stämme, die in der unverdünnten Lauge submerse Entwicklung zeigten, und zwar aus Walderde bei Kladno und aus Schlag 1 und 6 des Limburger-Hofes. Von *Penicillium bicolor* gedeihen hier die Stämme vom Kökensattel und unter Haselnußstauden Maria-Zell.

*Penicillium elegans* Corda. Dieses fällt auf Sopp- sowie Czapek-Agar durch den hellgrünen Konidienrasen auf. Der Konidienträger ist noch feiner und zarter gebaut als bei *P. luteum*. Nach 14 Tagen erscheinen kleine, gelbe Sklerotien. Auf Cellulosestreifen deutliche Deckenbildung mit gelben Sklerotien.

*Penicillium purpurogenum* Stoll. Der asymmetrische Konidienträger ist wenig typisch. Charakteristisch sind die deutlichen roten Abscheidungen in das Substrat. Auf Cellulosestreifen grüne Lager, das Substrat wird rot gefärbt. 5%ige Glucose- und Saccharoselösungen zeigen grüne Konidieninseln.

Die naheverwandte Gattung *Scopulariopsis* stellt nur einen Vertreter: *S. brevicaule* Thom-Bainier.

#### *Familie Helotiaceae.*

*Botrytis cinerea*. Im Erdboden scheinen häufig nur die Sklerotien vorhanden zu sein. In den Rohkulturen erscheinen zunächst grauweiße derbe Mycellager, in denen nach 14 Tagen die schwarzen Sklerotien entstehen. Überimpft man diese Sklerotien nun auf frischen Bierwürzeagar oder 10%ige Lösungen von Glucose, so erscheint die Konidienform von *Botrytis cinerea*. Impft man nun von hier auf Cellulosestreifen weiter, so gelangen meist in einem grauen Mycel wieder die Sklerotien zur Entwicklung. Eine Konidienform gelangt hier nicht zur Ausbildung. In flüssigen Substraten submerses Wachstum; die Hyphen speichern etwas Öl. Sklerotien werden nicht gebildet. Einzelne Stämme, so aus dem Erdreich unter Heidelbeeren und Haselnüssen, weisen in Glucose- sowie Saccharoselösungen Schleimbildung auf; daneben ist auf eine geringe Fettspeicherung in den Hyphen hinzuweisen.

#### *Familie Sphaerulineae.*

Die Konidienform von *Sphaerulina intermixta* ist unter dem Namen *Dematium pullulans* de Bary bekannt. Im Erdboden ist diese Konidienform sehr verbreitet und wurde hier sehr oft isoliert. Bei einzelnen

Stämmen glückte im Kulturversuch auch die Heranzüchtung von Perithezien. (vgl. *Bennet*). Die Vielgestaltigkeit dieses Pilzes zeigte sich auch hier wieder; in der Richtung verhalten sich die einzelnen Stämme übereinstimmend. In den ersten Tagen der Kultur entstehen auf Bierwürzeagar helle, leicht schleimige Lager, die überreichlich Konidien und Hefezellen absondern (vgl. *Bauer*). Nach einer etwas längeren Kulturdauer verwandeln sich dann Mycelstückchen und Hefezellen in die dunklen Gemmen, welche nun der Kultur das bekannte grauschwarze Aussehen verleihen. Konidien, Hefezellen und Mycelstückchen führen deutliche Öltropfen. Die langsam eintretende Verfärbung der Kulturen ist ein sehr typisches Merkmal. In 5%igen Glucose- sowie Saccharoselösungen tritt nur submerses Wachstum ein. Deutlich ist die Schleimbildung, mäßig ist die Ablagerung von Öltropfen. Die Verfärbung der Kulturen tritt hier nur sehr langsam ein. Gute Entwicklung mit deutlich glänzender Schwarzfärbung ist auf den Cellulosestreifen zu verfolgen. Der Pilz dringt in das Innere des Substrats ein, durchsetzt die Fasern und verwandelt sie in eine schwarze, glänzende, weiche Masse. Einzelne Stämme, so aus dem Kalkgestein der Oetschergräben und unter Geranumbeständen Maria-Zell, gedeihen hier nur kümmerlich und formen nur ein leichtes, grauschwarzes Mycel. Andererseits sind manche Stämme zu besonders intensiver Arbeit fähig: dies gilt für den Stamm aus Schlag 5 des Limburger-Hofes, welcher die Cellulosestreifen in eine weiche, gallertige, schwarze Masse umwandelt, in der im mikroskopischen Bilde viele Sphaerokristalle auffallen. Nach dem Aussehen wären sie als ausgefällte Salze der Citronensäure zu deuten. Perithecienvbildung konnte bei zwei Stämmen, und zwar aus einem Kartoffelfeld bei Maria-Zell aus und Waldboden bei Radeschowitz in Böhmen erzielt werden.

Sulfitlaugen werden von diesen Pilzstämmen abgelehnt. Nach den Angaben von *Perwoznansky* versuchten wir die Stämme mit Chinasäure als alleiniger C-Quelle zu züchten. Entweder tritt kein oder nur schwaches Wachstum ein. Diese Eigenschaft kann dazu dienen, diesen Pilz von anderen ähnlichen Schwärzepilzen, welche hier gedeihen, zu trennen.

#### *Familie Mycosphaerellaceae.*

*M. Tulasnei* besitzt als Konidienform den Namen *Cladosporium herbarum* Pers. Dieser im Erdreich sehr verbreitete Pilz bildet ein grünschwarzes, wolliges Luftmycel und ein eingesenktes schwarzes Substratmycel. Typisch ist die Konidienbildung, welche an nebeneinanderliegenden Konidienträgern reihenweise erfolgt. Meist sind die Konidien ei- bis citronenförmig und von gelblicher Farbe. Die gelb-braunen, reichlich septierten Hyphen speichern etwas Fett. In manchen Fällen ist die Konidienbildung sehr spärlich oder sie tritt auch nur sehr langsam ein. In der vorhin beschriebenen Art bilden folgende Stämme reichlich Konidien: Weideflächen Bürgeralm, Kalksand Oetschergräben,

Gemeindealm, Haferfeld (Maria-Zell), Walderde bei Kladno. Gelegentlich werden neben den eiförmigen Konidien auch noch längere stabförmige, mit abgestumpften Ecken abgesondert: sie führen ein, zwei oder drei Septen. Dies ist bei den Stämmen nachstehender Herkunft der Fall: Haselnußhecken, Gnadenwald, Weideflächen an der Salzaklamm (Maria-Zell). In einem einzigen Falle, und zwar bei dem Stamm aus Walderde bei Kladno, wurden auf den Kulturen in Bierwürzeagar dunkle, etwa  $1/2$  mm große sterile Sklerotien erkannt. Auf angefeuchteten Dörrpflaumen tritt nie ein Wachstum ein. In 5%igen Glucose- und Saccharoselösungen ist das Wachstum schwach und nur submers; Farbstoffbildung tritt nicht ein. Die Speicherung von Ölträpfchen ist gering. Cellulosestreifen werden von den einzelnen Stämmen sehr ungleich besiedelt. Stämme nachstehender Herkunft zeigen hier Entwicklung und bedingen eine dunkle Verfärbung des Substrats. Geranium-bestand, Haselnußhecken, Kalksand Oetschergräben (Maria-Zell). Die anderen Stämme entwickeln sich auf Cellulose nicht. Sulfitablaugen von Zellstoffbetrieben werden von allen Stämmen nur sehr schlecht verwertet.

*Fungi imperfecti.*

*Familie Mucedinaceae.*

*Trichoderma Koningi Oudem* ist im Erdreich sehr verbreitet. Diese Art ist schon früher von uns genau beschrieben worden [Niethammer (1)] und sie zeigt hier keine Abweichungen. Alle hier isolierten Stämme besitzen die Fähigkeit, auf Cellulosestreifen gute Decken zu bilden. Die Myzelfäden dringen in das Substrat ein: oberflächlich erscheinen die grünen Konidienlager. Die gute Entwicklung auf Erdpartikelchen ist zu erwähnen. In Sulfitablaugen von Zellstofffabriken entstehen bei Verdünnung mit 50% Wasser submerse, schleimige Kugeln, ohne Konidienabsonderung.

Gattung *Verticillium* Nees. *V. chlamydosporum* Niethammer kommt nur vereinzelt vor. Leicht zu erkennen durch die kräftige Absonderung von *Chlamydosporen*. *V. ruberrinum* Bonord. Die Konidien werden von einem langen, wirtelig verzweigten Träger abgesondert. Die rötliche Färbung der Kultur und des Substrats ist typisch.

*Arthrobotrys arthrobotryoides* Berl. Dieser Pilz wurde früher nie im Erdboden erkannt. Auf Bierwürzeagar fällt er durch samtige, rosa Lager auf. Der aufrechte Konidienträger ist an der Spitze blasig angeschwollen, solche Anschwellungen sind auch unterhalb der Spitze und in der Mitte des 150—200  $\mu$  langen Konidienträgers zu sehen. Die Konidien sind eiförmig bis länglich, etwa 20  $\mu$  lang und an einem Ende sehr deutlich in die Spitze gezogen. Ein- oder zweizellige sind vorhanden. Gelegentlich werden sie auch in eigenen Lagern abgesondert (Abb. 2). Auf Streifen von Zell- oder Holzstoff werden dichte, samtige, rosa Lager

geformt. Haselnußschalen werden gerne besiedelt; in diesem Zusammenhang ist nochmals darauf hinzuweisen, daß diese Art auch aus Haselnüssen isoliert werden konnte.

#### Familie *Dematiaceae*.

Aus der Gattung *Torula* isolierten wir *T. pucherrima* Lindner. Die Beschreibung nach Lodder deckt sich völlig mit unseren Erfahrungen.

Die Gattung *Alternaria* stellt einen wichtigen Vertreter in *A. tenuis* Nees. Auf Bierwürzeagar sind die schwarzgrünen, wolligen Überzüge zu nennen, die in das Substrat schwarze, glänzende Hyphen ein senken. Die keulenförmigen, mauerartig unterteilten Konidien, die an der Basis in die Spitze gezogen sind, erscheinen typisch (Abb. 3). Ihre Länge schwankt zwischen 15 und 30  $\mu$ . Auf Cellulosestreifen werden schwarze, eingesenkte Lager mit sehr reichlicher Konidienabsonderung geformt. Hier erscheinen auch sterile Sklerotien. Zu erwähnen ist, daß alle Stämme Chinasäure als alleinige Kohlenstoffquelle sehr gut verarbeiten können.

Die Gattung *Macrosporium* Fries. ist durch *M. commune* Rabenhorst vertreten. Die Konidien sind breit und stumpflich abgerundet. Die Ausbildung auf Bierwürzeagar ist der von *Alternaria* ähnlich. Auf Cellulosestreifen ist gutes Wachstum. Gelegentlich sind dunkle Sklerotien zu beobachten.

#### Familie *Tuberculariaceae*.

Die Gattung *Fusarium* wurde mit zahlreichen Vertretern isoliert. Je nach dem Nährsubstrat verschiedene Ausbildungsarten. Konidienbildung tritt am besten auf Kartoffelstückchen ein. Das Farbenspiel erscheint auf Bierwürzeagar sehr deutlich. In 5%igen Glucose- oder Saccharoselösungen tritt nur submerses Wachstum ein. Die Hyphen speichern unter diesen Bedingungen deutliche Mengen an hyalinen oder gelblichen Ölträpfchen. Nicht selten treten Erweiterungen der Hyphen auf. Oidienbildung ist zu erkennen. Auf Cellulosestreifen werden watteartige Überzüge und manchmal gelbrote Sklerotien geformt. Wir führen hier nochmals an, daß die *Fusarium*-Arten in Gegenwart eines anderen Pilzstammes, so eines *Mucor*, am besten gedeihen. In einer solchen Vergesellschaftung tritt sehr starke Ölspeicherung ein.

*F. dimerum* Penz. Sowohl auf Kartoffeln als auf Bierwürze sind Stroma und Mycel zunächst weiß, erst langsam tritt eine rosa bis in-



Abb. 2. *Arthrobotrys arthrobotryoides*. Einzelne Konidien in ihrer Bildung. Vergr. 1000.



Abb. 3. *Alternaria tenuis*. Die typischen, in die Spitze auslaufenden Konidien. Vergr. 800.

carnatfarbene Färbung ein. Die Konidien sind verhältnismäßig klein,  $12-20 \mu$  lang und etwa  $2,5-4 \mu$  breit. Meist ist nur eine Septe vorhanden. Rundliche Chlamydosporen sind zu Ketten vereint. In den Hyphen werden sowohl auf Bierwürzeagar als in 5%igen Glucose- oder Saccharoselösungen Öltröpfchen gespeichert. *Rabenhorst* zeigt hier desgleichen in seiner Abbildung Öltröpfchen. Der Stamm aus Bažantice bei Kladno weist einen wirtelig verzweigten Konidienträger auf, an dem die einzelnen Konidien abgesondert werden. Der gleiche Stamm speichert in Glucose- und Saccharoselösungen besonders reichlich Öltropfen; vielfach fallen verbreiterte Hyphen mit großen, gelben Öleinschlüssen auf. Oidienbildung ist zu erwähnen. Bei der Vereinigung mit *Mucor hiemalis* ist die Absonderung von Öltropfen besonders reichlich. Auf Cellulosestreifen entstehen bei allen Stämmen derbwandige Lager.

*F. sporotrichoides* Sherb. Nur einmal vom Schlag 7 des Limburger-Hofes isoliert. Die hellen Konidien sind im Mycel eingestreut. Die Mikrokonidien sind typisch birnenförmig; daneben sind drei- bis fünfseptierte Konidien mit deutlichen Öltropfen. In Massen sind die Konidien ocker- bis lachsfarben, manchmal orangerot. Im Alter trocknen sie harzig ein. Masse der Konidien: Die einzelligen sind  $8-12 \times 2,2-3,2 \mu$ , die Triseptaten  $25-33 \times 3,4-4 \mu$  groß. Das Stroma ist lehm- bis ockerfarben. Die interkalaren Chlamydosporen sind  $7-14 \mu$  groß.

*F. avenaceum* Sacc. Typisch sind die länglichen, fadenförmigen Konidien. Ihre Absonderung erfolgt meist lagerförmig, so in Sporodochien. Meist 3-5 Septen,  $30-48 \times 2,7-3,9 \mu$  (Triseptaten),  $45-66 \times 3,1-4,4 \mu$  (Quinquespattaten). Das Luftmycel ist auf Kartoffeln weißlich, das Stroma gelb bis orangegelb. In 5%igen Glucose- oder Saccharoselösungen submerses Wachstum, deutliche rote Verfärbung; in den Hyphen Speicherung von Öltropfen. Diese Art wurde nur einmal aus Walderde bei Beraun isoliert, sie ist innig mit *Trichoderma Koningsi* vergesellschaftet.

*F. scirpi* Lamb. et Jantz. Entspricht den Angaben von *Wollenweber* und *Reinking*. Das Luftmycel ist weiß, darunter liegt ein brauner bis roter Schleim. Die Konidien sind sehr deutlich sichelförmig gebogen und weisen eine leichte Windung auf. In 5%igen Glucose- oder Saccharoselösungen wird in den Hyphen sehr deutlich Öl gespeichert. In verbreiterten Hyphenstücken sind rote und gelbliche harzartige Einschlüsse zu nennen.

*F. scirpi* var. *acuminatum* *Wollenweber*. Diese Art wurde nur von einem Standort in Gnadenwald (Maria-Zell) isoliert. Die stark sichelförmigen, in die Spitze gezogenen Konidien sind typisch. Das Stroma erleidet rote bis purpurne Verfärbungen.

*F. orthoceras* *Wollenweber* und *Reinking*. Diese Art wurde sehr häufig isoliert. Für die Kulturen auf Bierwürzeagar sowie Kartoffeln gelten die von *Wollenweber* und *Reinking* gemachten Angaben. In

5%igen Saccharose- oder Glucoselösungen nur submerses Wachstum. Es werden große, sich bald rosarot verfärbende Kugeln gebildet. Die Hyphen speichern reichlich Öltropfen; in manchen Hyphen sind auch rote und gelbe olartige Massen zu erkennen. Reichlich werden unter diesen Bedingungen Chlamydosporen geformt, die ebenfalls Öl enthalten (Abb. 4). Ablaufen von Zellstofffabriken können genutzt werden, wenn sie zu etwa 60% mit Wasser verdünnt werden. Das Wachstum erfolgt in Form einer großen submersen Kugel. Die etwas aufgetriebenen Hyphen führen sehr große Öltropfen. Auf eine große Zahl von Chlamydosporen ist wieder hinzuweisen. Die meisten der isolierten Stämme bilden anfänglich (vgl. auch *Wollenweber*) nur zahlreiche in das Luftmycel eingestreute Mikrokonidien. Die großen dreiteiligen Konidien erscheinen gewöhnlich erst nach längerer Kulturdauer. Sie entstehen lagerförmig oder durch Absonderung an verzweigten Konidienträgern. Helle, später rosa und rot getönte Chlamydosporen sind zahlreich vorhanden. Auf Cellulosestreifen entwickelt sich ein dünnes Mycel, welches in das Substrat hineindringt und äußerlich rotgelbe Sklerotien formt, die in ihrem Innern reichlich septierte Konidien zeigen. Bei der Isolierung fällt auf, daß diese Art meist mit *Mucor hiemalis* oder *silvaticus* vergesellschaftet ist.

*F. bulbigenum* Cke. et Mass. Das plektenchymatische Stroma auf Kartoffeln ist gelblich, das Luftmycel weiß bis rosa, Lilatöne sind charakteristisch. Etwa 1 mm große sklerotiale Körperchen von gelber Farbe sind zu nennen. Die Triseptaten der Konidien sind 34–44  $\mu$ , die Quinquesepatten 45–56  $\mu$  lang. Die Konidien sind schwach sickelförmig gebogen; am Ende weisen sie eine leichte Krümmung auf. Sie sind mehr im Stroma als im Luftmycel zu finden. Auf Bierwürzeagar tritt nach 3–4 Wochen Kulturdauer die Lilatönung des Stromas sehr deutlich hervor. In 5%igen Glucose- und Saccharoselösungen submerser Entwicklung; in den Hyphen Speicherung von Öltropfen. Auf Cellulosestreifen deutliche Entwicklung; die Hyphen sondern Schleim ab und verwandeln das Substrat in eine weiche Masse. Rote bis Lilaverfärbungen sind zu verzeichnen.

*F. solani* Aast., App. et Wr. Im Erdreich sehr verbreitet. Auf Bierwürzeagar sowie Kartoffeln gelten für die Entwicklungsweise die von

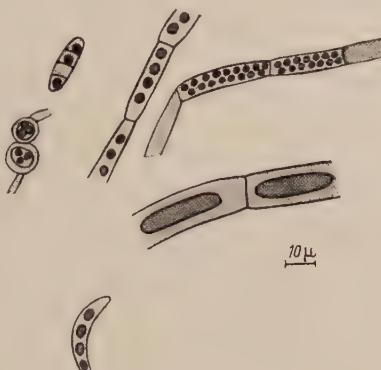


Abb. 4. *Fusarium oxysporum* und *orthoceras*.  
Speicherung von Fettropfen in Hyphen,  
Konidien sowie Chlamydosporen. Vergr. 400.

*Wollenweber* und *Reinking* gemachten Angaben. Typisch sind die wenig gekrümmten, breiten und an beiden Enden abgestumpften Konidien. Sie entstehen meist in Sporodochien. Häufig führen sie mehrere Öltropfen, dann sind die Septen nur schwach wahrnehmbar. Die Chlamydosporen erleiden eine Lilaverfärbung und führen ein bis zwei hyaline mächtige Öltropfen. In 5%igen Lösungen von Glucose oder Saccharose die übliche Speicherung von Öltropfen. Auf Cellulosestreifen flockige, weiße Überzüge; das Substrat wird nicht aufgeweicht. Meist ist Vergesellschaftung mit *Mucor hiemalis* gegeben.

*F. solani* var. *Martii*. *App.* et *Wr.* Im wesentlichen sind hier wieder die Angaben von *Wollenweber*-*Reinking* zu vergleichen. Auf Kartoffeln deutlich rosa Stroma, darüber ein weißes, im Alter bräunliches Luftmycel. Auf Bierwürzeagar ein rosa Schleim, der eingesenkt ist, darüber wieder ein weißes Luftmycel. Die Konidien werden in Pionnotes oder von einfachen Konidienträgern abgesondert. In 5%igen Glucose- sowie Saccharoselösungen submerses Wachstum und Ablagerung von hyalinen und gelben Öltropfen. Auf Cellulosestreifen derbe, filzige Lager, die an den Hyphen plumpe, mit mehreren hyalinen Öltropfen versehene Konidien absondern. In dieses Mycel sind gelbliche bis rosagetönte Sklerotien eingelagert.

*F. oxyoporum* *Wollenweber*-*Reinking* entspricht den Angaben dieser Autoren.

#### 4. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Unsere Untersuchungen stellen einen neuen Beweis für das Vorhandensein typischer Bodenpilze dar. Gesteinsart, Boden sowie Bestandspflanzen können, im Bereiche unserer Untersuchungen, keine grundlegende Änderung, sondern nur bestimmte Abweichungen bedingen. Die gute Entwicklungsmöglichkeit vieler Stämme auf Zellstoffstreifen ist zu erwähnen; ein deutlicher Abbau tritt dabei jedoch selten in Erscheinung. Verschiedene Arten der Gattung *Mucor* und *Fusarium* speichern besonders in flüssigen Medien in Hyphen, Gemmen, Kugelzellen oder Chlamydosporen reichlich Öltropfen.

#### Literatur.

*Bauer, R.*, Zentralbl. f. Bakt. **98**, II, 133, 1938. — *Bennet, F.*, Ann. appl. Biology **5**, 191, 1928. — *Lodder, I.*, Die Hefesammlung des Centraal-Bureau voor Schimmelcultures. Beiträge zu einer Monographie der Hefearten. II. Teil. Anasporogene Hefen. Amsterdam, Noord-Hollandsche uitgevermaatsch., 1934. — (1) *Niethammer, A.*, Die mikroskopischen Bodenpilze. Haag, W. Junk, 1937. — (2) *Dieselbe*, Arch. f. Mikrobiol. **10**, 13, 1939. — (3) *Dieselbe*, Zentralbl. f. Bakt. **98**, II, 65, 1938. — *Perwonzky*, ebenda **81**, 372, 1930. — *Rabenhorst, L.*, Kryptogamenflora Bd. IX, S. 560 (*Fusarium dimerum*). — *Szilvinyi, A. von*, Zentralbl. f. Bakt. **103**, II, 133, 1941. — *Wollenweber, F.*, u. A. *Reinking*, Die Fusarien. Berlin, P. Parey, 1935. — *Zycha, H.*, Mucorineae. Leipzig, Borntraeger, 1935.

(Aus dem Institut für Bodenkunde der Landwirtschaftlich-forstlichen  
Fakultät der Universität Zagreb.)

## Mikrobiologische Untersuchungen einiger podsoliger Böden Kroatiens\*.

Von  
Artur Stare.

(Eingegangen am 17. September 1941.)

Die vorliegende Arbeit bildet einen ersten Beitrag zur Kenntnis der Mikrobiologie der kroatischen Böden. Es wurden podsolige Naturböden untersucht, die im kontinentalen Kroatien den fast ausschließlichen klimazonalen Bodentypus darstellen [*M. Gračanin* (8)]; außerdem ist die morphologische und physikalisch-chemische Differenzierung des Podsolprofils in verschiedenen Horizonten für das Studium der mikrobiologischen Eigenschaften des Profils sehr geeignet. Es wurden vier ungleich podsolierte Böden des mittleren Kroatien einer eingehenden Untersuchung unterworfen, um festzustellen, in welcher Weise sich die Individualität dieses Bodentypus in seinen mikrobiologischen Eigenschaften äußert, und in welchem Maße der Podsolierungsgrad die Zahl, Arten und Tätigkeit der Bodenmikroorganismen beeinflußt.

### I. Die mechanischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften der Profile.

Um eine richtige Vorstellung über die untersuchten Böden als natürlicher Substrate für die Entwicklung von Mikroorganismen zu bekommen, und den Zusammenhang einer solchen Entwicklung mit den Bodeneigenschaften zu bestimmen, wurden die mechanischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften der Profile untersucht (Tabellen I, II und III).

Die mechanische Zusammensetzung wurde nach der Schlämmmethode von *Kopecky* bestimmt, der Rohton (Bodenkörnchen  $< 0,002$  mm) mit der Pipettenmethode nach *M. Gračanin* (7), die Wasser- und Luftkapazität nach *Kopecky*, die Humusmenge nach *Knop*, der Ammoniakstickstoff nach *J. Harper* (10) und Nitratstickstoff nach *H. Riehm* (21). Für die elektrometrischen Reaktionsbestimmungen wurde die Chinchydronelektrode und

\* Dissertation. Hier ist nur eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse gegeben. Eine ausführliche Bearbeitung ist in kroatischer Sprache in „*Poljoprivredna naučna smotra*“ 4, 1941, erschienen. Herrn Prof. *M. Gračanin*, dem Vorstand des Instituts für Bodenkunde, wie den Herren Professoren *V. Skorić* und *I. Pevalek* bin ich für die Beihilfe und Unterstützung zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Bodensuspension angewandt. Die Werte für  $S$ ,  $T$  und  $V$  sind der Arbeit von *M. Gračanin* und *J. Verlić* (9) entnommen.

Nach der mechanischen Zusammensetzung gehören die Profile I und II (tiefe diluvial-deluviale Böden) zu den lehmigen Tonböden, das Profil III

Tabelle I. Mechanische Zusammensetzung der Profile.

Profil	Horizont	Tiefe cm	Prozentgehalt der Bodenkörnchen					Bezeichnung der Bodentextur
			2—0,1	0,1 —0,05	mm 0,05 —0,01	<0,01	<0,002	
I. Maksimir- Wiese	$A_1$	3—8	4,93	6,01	44,12	44,94	10,50	toniger Lehm
	$A_2$	20—25	2,91	3,99	39,22	54,08	13,69	lehmiger Ton
	$A_2 B_1$	35—40	1,90	4,68	44,48	48,94	6,47	toniger Lehm
	$B_1$	65—75	1,64	8,80	42,50	47,06	4,66	toniger Lehm
	$B_2$	135—145	2,00	5,04	32,92	60,04	5,48	Ton
II. Maksimir- Wald	$A_1$	2—6	6,30	7,32	44,10	42,28	9,92	toniger Lehm
	$A_2$	13—19	2,64	5,34	38,46	53,36	12,45	lehmiger Ton
	$A_2 B_1$	26—30	4,14	7,72	37,72	50,42	16,66	lehmiger Ton
	$B_1$	50—60	3,30	6,04	39,28	51,28	17,70	lehmiger Ton
III. Čazma- Wald	$A_1$	3—6	13,24	10,28	41,86	34,62	8,95	Lehm
	$A_2$	13—18	11,24	8,64	42,20	37,62	10,18	Lehm
	$A_2 B_1$	22—28	21,04	10,96	29,36	38,44	10,29	ton.-sand. Lehm
	$B_1$	35—45	39,00	11,92	20,48	28,60	12,52	ton.-sand. Lehm
IV. Djurmanec- Wiese	$A_1$	2—8	47,44	12,52	11,56	24,48	11,29	lehmiger Sand
	$A_2$	15—20	52,82	11,68	8,88	26,62	13,85	lehmiger Sand
	$B$	36—43	36,72	25,22	22,34	15,72	17,70	ton.-lehm. Sand
	$B C$	76—90	35,28	29,50	14,68	20,54	9,46	ton.-lehm. Sand

Tabelle II. Physikalische Eigenschaften der Profile.

Profil	Horizont	Spezi- fisches Gewicht	Poren- volumen	Abs. Kapazität für		Moment Wasser	Gehalt an Luft
				Wasser	Luft		
I.	$A_1$	2,60	54,92	38,41	16,51	33,87	21,05
	$A_2$	2,65	49,63	34,42	15,01	30,96	18,47
	$A_2 B_1$	2,75	47,64	34,33	13,31	34,81	12,83
	$B_1$	2,70	45,19	34,07	11,12	36,56	8,63
	$B_2$	2,77	43,55	34,25	9,30	32,59	10,96
II.	$A_1$	2,61	60,15	40,78	19,37	15,27	44,88
	$A_2$	2,67	55,83	37,27	18,46	16,17	40,46
	$A_2 B_1$	2,66	49,28	35,13	14,75	17,00	32,28
	$B_1$	2,73	47,19	37,98	10,21	18,31	28,88
III.	$A_1$	2,67	54,90	35,22	19,68	33,24	21,66
	$A_2$	2,69	49,84	35,86	13,98	31,00	18,84
	$A_2 B_1$	2,71	46,60	33,57	18,13	30,03	17,57
	$B_1$	2,72	39,90	28,82	11,92	29,88	10,02
IV.	$A_1$	2,59	54,82	36,07	18,75	19,16	23,76
	$A_2$	2,67	46,30	29,16	17,34	21,46	21,14
	$B$	2,70	47,90	25,80	22,10	28,83	19,07
	$B C$	2,71	37,35	28,96	9,39	30,74	7,61

Tabelle III. Chemische Eigenschaften der Profile.

Profil	Horizont	Humus %	mg N je kg Boden		pH in		S mg äqu.	T mg äqu.	V %
			NH <sub>3</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	H <sub>2</sub> O	n-K Cl			
I.	<i>A<sub>1</sub></i>	3,00	10,2	0,0	5,68	4,13	9,50	18,99	50,03
	<i>A<sub>2</sub></i>	1,28	8,0	0,0	5,48	3,96	6,66	13,60	48,97
	<i>A<sub>2</sub> B<sub>1</sub></i>	0,91	—	0,5	5,22	3,74	8,48	15,64	54,22
	<i>B<sub>1</sub></i>	0,37	4,4	0,5	5,67	3,46	16,94	27,51	61,58
	<i>B<sub>2</sub></i>	0,41	—	0,5	5,79	4,50	22,79	26,56	85,81
II.	<i>A<sub>1</sub></i>	4,32	21,0	0,0	4,41	3,55	5,84	26,06	22,45
	<i>A<sub>2</sub></i>	1,56	2,5	0,0	4,43	3,51	4,84	17,35	27,95
	<i>A<sub>2</sub> B<sub>1</sub></i>	1,05	—	0,0	4,53	3,23	5,55	18,25	30,41
	<i>B<sub>1</sub></i>	0,34	1,0	0,0	4,92	3,47	7,63	17,60	43,35
III.	<i>A<sub>1</sub></i>	2,93	20,1	0,5	4,87	3,64	6,23	20,35	31,06
	<i>A<sub>2</sub></i>	1,03	12,5	0,5	4,97	3,60	3,47	21,93	15,82
	<i>A<sub>2</sub> B<sub>1</sub></i>	0,57	5,0	0,5	4,96	3,48	4,89	24,94	19,03
	<i>B<sub>1</sub></i>	0,29	0,0	0,0	5,06	3,43	7,81	21,45	36,41
IV.	<i>A<sub>1</sub></i>	2,87	14,0	0,5	6,01	5,03	19,27	23,95	80,46
	<i>A<sub>2</sub></i>	0,59	5,5	0,5	5,95	4,66	16,19	18,86	85,84
	<i>B</i>	0,02	0,0	0,0	5,73	4,14	21,31	25,56	83,57
	<i>B C</i>	—	—	0,0	5,50	3,54	24,17	28,34	85,29

(dünner Granitboden) zu den Lehmböden und das Profil IV (schwach entwickelter Boden auf Sozka-Schichten) zu den tonigen Sandböden.

Die untersuchten Böden zeigen günstige Wasser- und Luftverhältnisse nur im elluvialen Horizont *A*, da schon in der Tiefe von 30–40 cm eine Verschlechterung der physikalischen Eigenschaften eintritt.

Die Profile zeigen eine kleine bis mäßige Humusmenge im Unterhorizont *A<sub>1</sub>*, die mit der Tiefe schnell abnimmt und sauren Charakter trägt. Es wurden ferner kleine Mengen von Ammoniakstickstoff und nur Spuren von Nitratstickstoff festgestellt. Die Reaktion der Böden ist schwach sauer bis stark sauer und liegt größtenteils unter dem Minimum für manche wichtige Gruppen der Bodenmikroorganismen. Die Reaktion auf Carbonaten war in allen Fällen negativ.

Die Analyse des Absorptionskomplexes bringt die podsolbildenden Vorgänge zum Ausdruck. Die Destruktions- und Versäuerungsvorgänge, wie auch die Migration von Basen und Sesquioxiden laufen in den Profilen desto stärker, je mächtiger der Boden podsoliert ist.

Auf Grund der bodenkundlichen Analyse und hauptsächlich der Verhältnisse im Absorptionskomplex können wir die untersuchten Böden in den Podsoltypus einreihen und nach dem Podsolierungsgrad folgendermaßen klassifizieren:

- das schwach podsolierte Profil IV (Djurmanec-Wiese);
- das mäßig podsolierte Profil I (Maksimir-Wiese);
- die stark podsolierten Profile II (Maksimir-Wald) und III (Čazma-Wald).

Unter der Voraussetzung, daß diese Eigenschaften der Profile auch in ihren mikrobiologischen Eigentümlichkeiten zum Ausdruck kommen, wurde eine mikrobiologische Analyse über die Zahl, Arten und biochemischen Vorgänge durchgeführt, die im folgenden dargestellt ist. Hierbei haben wir eine Methodik angewandt, die den natürlichen Bedingungen im Boden möglichst nahe kommt.

## II. Die Zahl der Mikroorganismen.

Zur Bestimmung der Zahl der Mikroorganismen wurde die direkte mikroskopische Methode nach *Germanov-Kaš* (18) (Tabelle IV), ferner das klassische Plattenverfahren (Tabelle V) angewandt. Dabei wurde möglichst mit synthetischen Nährböden gearbeitet; für die heterotrophen *aeroben Bakterien* und *Actinomyceten* mit Casein-Agar [S. A. Waksman (25)], für die Pilze mit Asparagin-Agar [H. L. Jensen (12)] und für die *Algen* (die nach der Verdünnungsmethode gezählt wurden) mit der Lösung nach *Bristol-Roach* (28). Die Zahl der *anaeroben Bakterien* wurde in Hochschichtagar unter Anwendung des Casein-Agars mit 1% Glucose bestimmt [S. A. Waksman (28)]. Zur Bestimmung der Sporen der *Bakterien* wurde die Pasteurisierung (10 Minuten bei 80° C), zur Bestimmung der *Pilz*-Sporen das Trocknungsverfahren nach *Mc Lennan* (16) angewandt. Alle diese Zählungen sind in sechsfachen Wiederholungen durchgeführt.

Mit der Methode der direkten mikroskopischen Zählung wurden erheblich größere Werte festgestellt als nach dem Plattenverfahren, jedoch geben die relativen Zahlen, welche die vertikale Verteilung der Mikroorganismen in den Profilen andeuten, ein übereinstimmendes Bild: diese Werte zeigen, daß die Zahl der Mikroorganismen in der Reihenfolge der Horizonte sich stark ändert, so daß der elluviale Unterhorizont  $A_1$  die größte Zahl enthält, und daß im ausgebleichten mineralischen Unterhorizont  $A_2$  — schon in der Tiefe von 15—25 cm — diese Zahl stark abnimmt. Im illuvialen Horizont  $B$  reduziert sich diese Zahl weiter auf die minimalen Werte, die gleichzeitig der Ausdruck sind für die minimale mikrobiologische Aktivität in dieser Tiefe.

Aus den Zählungen der morphologischen Gruppen der Mikroorganismen im Sehfeld des Mikroskops geht hervor, daß die Gruppe der kleinen *Kokken* und kurzen *Stäbchen* in allen Profilen am stärksten vertreten ist, daß die Gruppe der *Pilze* und *Actinomyceten* aber zahlenmäßig sehr gering ist. Die Anzahl der mikroskopischen Kolonien [Glomerulen nach *G. Rossi* (22)] ist ebenfalls gering und hauptsächlich auf den elluvialen Horizont beschränkt; diese mikroskopischen Kolonien sind größtenteils aus 10—30 kokkoiden oder kurzstäbchenförmigen Zellen zusammengesetzt. Wie bekannt, ist die Differenzierung der Mikroorganismen in solche morphologische Gruppen schwer durchführbar; jedoch kann, im Zusammenhang mit den Plattenverfahren, auch die direkte mikroskopische Methode die mikrobiologische Charakterisierung der Bodentypen ergänzen.

Tabelle IV.  
Die Gesamtzahl der Mikroorganismen nach der direkten mikroskopischen Methode  
(Zahlen in Millionen je g Boden).

Profil	Horizont	Tiefe cm	Kleine Kokken und kurze Stäbchen	Große Kokken und kokoide Formen	Mittlere und lange Stäbchen	Pilzhyphen und Actino- myzeten	Gesamtzahl		Mikro- skopische Kolonien
							absolut	relativ	
I.	$A_1$	2—8	903,3	218,2	151,4	11,9	1283,9	100	3,6
	$A_2 B_1$	20—25	273,4	69,0	81,5	5,5	429,4	33,4	8,0
	$A_2 B_1$	35—40	101,0	9,0	37,3	0,9	148,5	11,6	1,4
	$B_2$	65—75	48,3	7,0	23,0	1,3	79,9	6,2	—
II.	$A_1$	135—145	14,5	—	20,1	0,7	35,3	2,7	—
	$A_2 B_1$	2—6	466,5	160,5	87,7	4,8	719,5	100	14,0
	$A_2 B_1$	13—19	343,9	68,0	50,1	7,6	469,6	65,3	10,6
	$B_1$	26—30	86,8	—	23,0	—	108,8	15,1	—
III.	$A_1$	50—60	24,2	—	17,4	—	41,6	5,8	—
	$A_2 B_1$	3—6	570,9	158,7	94,2	2,0	825,8	100	23,3
	$A_2 B_1$	13—18	248,6	60,4	73,3	—	382,3	46,3	10,3
	$B_1$	22—28	110,6	58,7	47,6	—	216,9	26,4	3,0
IV.	$A_1$	35—46	6,6	2,8	4,0	—	13,4	1,6	—
	$A_2 B_1$	2—8	1057,6	177,8	251,4	8,5	1495,3	100	20,5
	$B_1$	15—20	173,2	33,7	61,3	—	268,2	18,0	5,7
	$B_1 C$	36—43	67,4	11,9	30,6	—	109,9	7,3	—
	$B_1 C$	76—90	12,5	3,0	6,5	—	22,0	1,5	—

Tabelle V.  
Die Zahl der einzelnen Gruppen von Mikroorganismen nach der Plattenmethode  
(in Tausend je g Boden).

Profil	Horizont	Aerobe Bakterien		Aktiv-nomy-esten		Bakterien-sporen		Anaerobe Bakterien		Gesamtzahl der Pilze		Pilz-sporen		Algen		Gesamtzahl der Mikroorganismen	
		absolut	relativ	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	relativ	absolut	%	absolut	relativ	absolut	relativ
J.	$A_1$	7800	100	2080				1950	20,2	119	100			25		11974	100
	$A_2$	1804	28,1	245				379	17,4	50	42,0			5		2473	20,8
	$B_1$	472	6,1	49				98	17,2	14	11,8			0,5		633	5,8
	$B_2$	10	0,1	0,5				1	8,3	6	5,8			0,1		18	1,5
II.	$A_1$	1291	100	191		1097	84,9	156	10,8	567	100	19,2	1		2209	100	
	$A_2$	1424	110,3	177		554	38,9	101	6,6	56	9,9	14,3	0,5		1758	79,6	
	$B_1$	276	21,4	123		115	41,7	36	11,5	35	6,2	14,3	0,1		505	21,3	
	$B_2$	61	4,7	16		16	26,2	7	10,3	5	0,9	8,0			89	4,0	
III.	$A_1$	2922	100	590		1216	41,7	296	9,2	296	100	15,2	5		4109	100	
	$A_2$	1264	43,6	671		415	32,8	38	3,0	38	12,8	9,7	1		2012	49,0	
	$B_1$	491	16,8	6		50	10,2	4	0,9	4	1,4	32,5	0,1		505	12,3	
	$B_2$	74	2,5	6		2	3,4	1	1,7	1	0,3	30,5	0,1		82	2,0	
IV.	$A_1$	16740	100	4920		6300	37,8	784	4,5	90	100	9,8	10		22544	100	
	$A_2$	4840	28,9	960		2630	54,4	556	10,3	21	23,3	13,9	1		6378	28,3	
	$B$	2090	12,5	292		207	9,9	60	2,8	3	3,3	8,6	0,05		2445	10,8	
	$C$	606	3,6	7		105	17,3	100	14,2	1	1,1				714	3,1	

Was die Ergebnisse der Plattenmethode betrifft (die mehr als Vergleichswerte zu betrachten sind), so kann man feststellen, daß die *aeroben*, heterotrophen *Bakterien* den größten Anteil an der Gesamtzahl ausmachen. Wenn wir die Werte im Horizont  $A_1$  mit den vorliegenden Angaben der Literatur vergleichen, so können wir feststellen, daß die Gesamtzahl der Mikroorganismen und die Zahl der *aeroben Bakterien* arm bis mäßig reich ist; ein größerer Teil dieser Bakterien liegt im Boden in Form von Sporen vor. Weiter ist aus der Tabelle zu ersehen, daß die Profile arm an *anaeroben Bakterien*, arm bis mäßig reich an *Actinomyceten* und mäßig bis sehr reich an *Pilzen* sind; diese liegen größtenteils als vegetatives Mycel im Boden vor. Ferner ist festzustellen, daß diese Profile eine geringere Zahl von *Algen* enthalten.

Die Zahl dieser Mikroorganismen im elluvialen Horizont  $A$ , wo der Einfluß des Podsolierungsgrades sich maßgebend äußert, ist großen Schwankungen unterworfen, mit Zunahme der Tiefe nimmt jedoch die Zahl der einzelnen Gruppen der Mikroorganismen in allen untersuchten Profilen stark ab. Diese schnelle Verminderung der Zahl ist bei den *Algen* und *Pilzen* am stärksten ausgeprägt, was hauptsächlich auf die Autotrophie der *Algen* bzw. aerobe Lebensweise der *Pilze* zurückzuführen ist. So ergibt sich also, daß die mikrobiologisch aktive Schicht des Bodenprofils sowohl hinsichtlich der Gesamtzahl, wie der Zahl der einzelnen Gruppen sehr dünn ist, was man als eine der hauptsächlichsten biologischen Charakteristiken der untersuchten Podsolböden betrachten kann.

Eine Analyse der Ergebnisse zeigt weiter, daß die Zahl der Mikroorganismen in Zusammenhang mit einzelnen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Profile steht. In Anbetracht der Komplexität dieser Erscheinungen, sowie der Unvollkommenheit der konventionellen Methoden, ist es ziemlich schwer, in einzelnen Fällen die Größe des Einflusses der verschiedenen Bodenfaktoren zu bestimmen. Die Bedeutung der Reaktion, die oft als Grenzfaktor zu betrachten ist, äußert sich im quantitativen Verhältnis der *Bakterien*, *Actinomyceten* und *Pilze*, dieser drei wichtigsten Gruppen der Mikropopulation der untersuchten Böden (Tabelle VI). Ebenso wurde ein Zusammenhang zwischen der

Tabelle VI. Einfluß der Reaktion auf das Verhältnis der *Bakterien*, *Actinomyceten* und *Pilze*  
(Zahl der Bakterien = 100).

Profil	II.	III.	I.	IV.
$p_H$ in Wasser .....	4,41	4,87	5,68	6,01
Bakterien .....	100	100	100	100
Actinomyceten .....	15,0	20,2	25,4	29,4
Pilze .....	44,4	10,1	1,5	0,5

\*

vertikalen Verteilung der Zahl der Mikroorganismen und der Humusmenge in den Profilen festgestellt, während der Einfluß der physikalischen Eigenschaften in einzelnen Horizonten nicht so augenscheinlich oder nicht so unmittelbar wie derjenige anderer Faktoren zum Ausdruck kommt<sup>1</sup>.

Bezüglich des Einflusses des Podsolierungsgrades sind die stärker podsolierten Waldprofile in der Gesamtzahl der Mikroorganismen ärmer, während die *Pilze* verhältnismäßig zahlreicher sind als bei den schwächer podsolierten Wiesenprofilen. Die große Zahl der *Pilze* können wir als eines der charakteristischen Merkmale der stark podsolierten Böden bezeichnen. Berücksichtigen wir weiter, daß sie sich größtenteils im vegetativen Zustand befinden, so kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die *Pilze* in biochemischen Vorgängen in Waldprofilen eine Zentralstellung einnehmen.

Der Podsolierungsgrad äußert sich wenig in der vertikalen Verteilung der Organismen. Die Tatsache, daß die stärker podsolierten Waldböden eine verhältnismäßig schwächere Abnahme der Mikroorganismenzahl im  $A_2$ -Horizont zeigen, läßt sich dadurch erklären, daß im  $A_1$ -Horizont dieser Böden die *Bakterien*, die sonst den größten Teil der Mikroorganismen ausmachen, durch das Vorherrschen der *Pilze* in ihrer Entwicklung stark gehemmt werden.

Diese Ergebnisse über die Zahl der Mikroorganismen in kroatischen podsoligen Böden stimmen im wesentlichen gut mit denen anderer Autoren [u. a. *A. S. Razumov* und *N. P. Remezov* (20); *V. Kaš* (13)] für Podsoltypen überein.

### III. Die Arten der Mikroorganismen.

Die Bestimmung der Mikroorganismen, die sich auf das Vorkommen der häufigsten Arten bzw. Gruppen der *Bakterien*, *Actinomyceten*, *Pilze* und *Algen* beschränkte, ist in Tabellen VII, VIII, IX und X zusammengestellt.

Das relative Vorkommen der einzelnen Arten auf den Platten ist durch Zahlen angedeutet (1 = selten, 2 = häufiger, 3 = sehr häufig). Die Bestimmung der Bakterien wurde durchgeführt nach *K. B. Lehmann* und *R. O. Neumann* (15) und *D. H. Bergey* (1) (die Nomenklatur nach dem letzten); der Actinomyceten nach *S. A. Waksman* (24) und *J. Duché* (4); der Pilze nach *H. Zycha* (32), *C. Thom* (23), *H. Wollenweber* und *O. A. Reinking* (31), *G. Lindau* (14) und *T. Ferraris* (5); der Algen nach *A. Geitler* (6) und *A. Pascher* (19).

Wie aus diesen Tabellen zu ersehen ist, sind die untersuchten Böden reich an *Pilzen* (50 Arten) und verhältnismäßig arm an *Bakterien*

<sup>1</sup> Die ausgeführte Analyse gibt nur einen groben Einblick in die physikalischen Eigenschaften der Profile.

Tabelle VII.

Bakterien	Profil I (Wiese)				Profil III (Wald)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>
1. <i>Cocaceae</i> :								
<i>Micrococcus luteus</i> (Schröter) Cohn . . .	2	—	1	—				
<i>M. candidans</i> Flügge . . . . .	2	1	—	—	—	1	—	—
<i>M. aurantiacus</i> (Schröter) Cohn . . . . .	1	—	—	1	1	1	—	—
<i>Sarcina flava</i> de Bary . . . . .								
2. <i>Bacteriaceae</i> :								
<i>Flavobacterium aurescens</i> (Ravenel)								
<i>Bergey</i> . . . . .						1	—	—
<i>Fl. brevis</i> (Frankland) <i>Bergey</i> . . . . .					2	2	1	—
<i>Chromobacterium janthinum</i> (Zopf)								
<i>Holland</i> . . . . .	1	—	—	—				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula . . . . .	1	3	—	—				
<i>Achromobacter hartlebii</i> (Jensen)								
<i>Bergey</i> . . . . .	3	3	1	—	—	1	3	—
<i>A. agile</i> (Jensen) <i>Bergey</i> . . . . .	—	2	—	—				
<i>A. sp. I</i> . . . . .	1	—	—	—	1	—	—	—
<i>A. sp. II</i> . . . . .								
3. <i>Bacillaceae</i> :								
<i>Bacillus mycooides</i> Flügge . . . . .								
<i>B. prausnitzii</i> Trevisan . . . . .	2	1	—	—	1	1	1	—
<i>B. megaterium</i> de Bary . . . . .	—	1	—	—				
<i>B. ruminatus</i> Gottheil . . . . .					1	—	—	—
<i>B. cereus</i> Frankland . . . . .	2	—	3	1	1	—	—	—
<i>B. terminalis</i> Migula . . . . .					3	2	—	—
<i>B. subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn . . . . .					—	—	1	—
<i>B. mesentericus</i> Flügge . . . . .					1	3	—	—
<i>B. vulgatus</i> Flügge . . . . .	2	—	—	—				
<i>B. cohaerens</i> Gottheil . . . . .	3	1	3	—				
<i>B. simplex</i> Gottheil . . . . .	3	—	2	—	2	1	2	1
<i>B. sp. I</i> . . . . .	1	1	—	—	2	—	2	—
<i>B. sp. II</i> . . . . .								

Tabelle VIII.

Actinomyceten	Profil I				Profil II				Profil III			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>
Gruppe <i>Albus</i> :												
<i>A. albus</i> Krainsky . . . . .	1	1	—	2	1	1	—	—	2	1	—	—
<i>A. albidoflavus</i> (Rossi-Doria)												
<i>Duché</i> . . . . .					—	1	1	1	—	—	1	—
<i>A. griseus</i> Krainsky . . . . .	1	—	1	—					1	—	—	—
<i>A. 218</i> Waksman et Curtis . . . . .									1	1	—	2
<i>A. diastaticus</i> Krainsky . . . . .	2	—	—	—								
<i>A. rutgersensis</i> Waksman et Curtis . . . . .	3	3	2	—	3	1	2	1	2	—	—	—
<i>A. violaceus</i> Waksman et Curtis . . . . .	1	—	—	—								
Gruppe <i>Chromogenes</i> :												
<i>A. lavendulae</i> Waksman et Curtis . . . . .	1	—	—	—								
<i>A. phaeochromogenes</i> Conn . . . . .	3	3	3	2	3	3	3	3	2	5	—	1
<i>A. viridochromogenes</i> Krainsky . . . . .	1	1	—	—	2	—	—	—	2	—	—	2
<i>A. aureus</i> Waksman et Curtis . . . . .					2	—	—	—	2	—	—	

## Tabelle IX.

Pilze	Profil I			Profil II			Profil III			Profil IV			
	<i>A</i> <sub>1</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub> <i>B</i> <sub>1</sub>	<i>B</i> <sub>1</sub>	<i>B</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub>1</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub> <i>B</i> <sub>1</sub>	<i>B</i> <sub>1</sub>	<i>A</i> <sub>1</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub> <i>B</i> <sub>1</sub>	<i>B</i> <sub>1</sub>
<b>A. Phycomycetes:</b>													
Peronosporales:													
<i>Pythium</i> sp. ....	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>B. Mucorinae:</b>													
<i>Mucor Ramanianus</i> Möller	1	3	2	—	—	1	1	—	—	—	1	—	—
<i>Zygorhynchus Virelli</i> em. <i>Vanstylosky</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>Absidia spinosa</i> Lendner	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>A. cylindrospora</i> Hogen	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>A. Butleri</i> Lendner	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>Mortierella paucella</i> var. <i>isabellina</i>	—	2	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Oudemansia</i> sp. ....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>C. Fungi imperfecti:</b>													
<b>1. Mucedinaceae:</b>													
<i>Cephalosporium aceruum</i> Corda	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	—
<i>C. sp.</i> ....	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Trichoderma Koningsi</i> Oudemans	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>T. lignorum</i> Hanz.	3	2	2	—	3	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>T. sp.</i> ....	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>Aspergillus flavus</i> Link	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>A. glaucus</i> T. C.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>A. nidulans</i> (Eidam) Winter	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Penicillium frequentans</i> Westling	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. rugulosum</i> Thom	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. vinaceum</i> Gilman	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. erinaceum</i> Dole	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	1
<i>P. chrysogenum</i> Thom	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. citrinum</i> Thom	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>P. viride</i> Westling	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1
<i>P. janthinellum</i> C. T.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. lilacinum</i> Thom	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. luteum</i> Zuckal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—

Tabelle IX (Fortsetzung).

Pilze	Profil I				Profil II				Profil III				Profil IV				
	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2</sub></i>	<i>A<sub>2</sub>B<sub>1</sub></i>	<i>B<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2</sub></i>	<i>A<sub>2</sub>B<sub>1</sub></i>	<i>B<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2</sub></i>	<i>A<sub>2</sub>B<sub>1</sub></i>	<i>B<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2</sub></i>	<i>B</i>	<i>BC</i>	
<i>P. luteum</i> -Gruppe .....	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>P. purpurogenum</i> -Gruppe .....	—	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3
<i>P. avellaneum</i> -Gruppe .....	—	—	—	1	3	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. sp. I</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. sp. II</i> .....	—	2	—	—	—	—	—	3	1	1	3	—	—	1	1	—	—
<i>P. sp. (P. rugulosum) I</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. sp. III</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. sp. IV</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Scopulariopsis communis</i> Bainier ? .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Trichothecum roseum</i> Link .....	—	2	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Dematiaceae:</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Synsporium biguttatum</i> Preus .....	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. sp.</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>Acremoniella fusca</i> var. <i>minor</i> Corda .....	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>Dematium</i> sp .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>Hormodendrum cladosporioides</i> Saccardo .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Stemphylium pacianum</i> Szabo .....	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Alternaria humicola</i> Oudemans .....	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Tuberulariaceae:</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Fusarium solani</i> App. et Woll. .....	—	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>F. oxysporum</i> Schlechterdahl .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>F. semitectum</i> var. <i>magas</i> Wollenweber .....	—	2	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>Fusarium</i> sp. .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sphaeropsidales:</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Chaetomella horrida</i> Oudemans .....	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>Coniothyrium Fuckelii</i> Saccardo .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>C. Basidiomycetes:</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Agaricaceae:</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Coprinus micaceus</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—
<i>Pleurotus radis</i> (Fr.) Pilat .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—

Tabelle X.

Algen	Profil I			
	<i>A</i> <sub>1</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub> <i>B</i> <sub>1</sub>	<i>B</i> <sub>1</sub>
<i>Cyanophyceae:</i>				
1. <i>Chroococaceae:</i>				
<i>Chroococcus</i> sp. ....	+	+		
2. <i>Nostocaceae:</i>				
<i>Nostoc ellipsosporum</i> (Desmaz) Rabh. ....	+	+	+	
<i>N. commune</i> Vaucher ....	+	+		
<i>N. calcicola</i> Breb. ....			+	
<i>N. Linckia</i> (Roth) Born. ....			+	+
<i>Anabaena variabilis</i> Kütz. ....	+	+		
<i>Cylindrospermum muscicola</i> Kütz. ....	+			
<i>C. licheniforme</i> var. <i>Lemmermanni</i> Glade ..	+	+		
3. <i>Oscillatoriaceae:</i>				
<i>Oscillatoria splendida</i> Grew. ....	+			
<i>O. sp.</i> ....	+			
<i>Phormidium autumnale</i> (Ag) Gom. ....	+	+		
<i>Ph. sp.</i> ....	+			
<i>Lyngbia aestuarii</i> (Mert) Liebmann ....	+			
<i>Schizothrix lateritia</i> (Kütz) Gom. ....			+	
4. <i>Rivulariaceae:</i>				
<i>Calothrix</i> sp. ....	+	+		
<i>Chlorophyceae:</i>				
1. <i>Volvocaceae:</i>				
<i>Chlamydomonas</i> sp. ....	+	+		
2. <i>Chlorococcaceae:</i>				
<i>Chlorococcum humicola</i> (Näg) Rabh. ....	+			
3. <i>Ulothriaceae:</i>				
<i>Hormidium flaccidum</i> Braun ....	+	+		
<i>Ulothrix subtilissimus</i> ....	+			

(25 Arten) und *Actinomyceten* (11 Arten); aus dem Profil I wurde eine ziemlich große Zahl von *Algen* isoliert (19 Arten).

Unter den hier bestimmten Arten gibt es solche, die häufiger vorkommen; bei den *Bakterien* einige *Bacillaceae* und *Bacteriaceae* (*B. cereus*, *B. terminalis*, *B. simplex*, *B. cohaerens*, *Ps. fluorescens*, *Ach. hartlebii*), bei den *Actinomyceten* die Sammelarten *A. phaeochromogenes* und *A. rutgersensis*, bei den Pilzen die Gattungen *Penicillium* und *Trichoderma*, und bei den Algen einige *Cyanophyceae* (*Nostoc*). Neben der großen Anzahl der kosmopolitischen Arten, die bei allen untersuchten Gruppen der Mikroorganismen nachgewiesen wurden, wurden auch solche Arten gefunden, die in der Literatur seltener angeführt sind und sich wahrscheinlich an die einzelnen Bodentypen angepaßt haben. Das gesammelte Material genügt aber jedenfalls nicht, um eine Liste der Standard-Mikroflora der kroatischen podsoligen Böden aufzustellen. Auch die Unterschiede, die zwischen einzelnen im ungleichen Maße

podsolierten Böden und zwischen einzelnen Horizonten eines und desselben Bodens festgestellt wurden, genügen nicht, um von spezifischen Mikroorganismen der genetischen Horizonte zu sprechen, obwohl sich diese in physikalischen und chemischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Es ist klar, daß mit den konventionellen Arbeitsmethoden hauptsächlich die kosmopolitisch sich anpassenden und widerstandsfähigen Organismen isoliert werden, die ein wirkliches Bild der Zusammensetzung der Mikroassoziationen in den Bodentypen nicht geben können, und daß bei Anwendung dieser Methoden die spezialisierten Arten, die an bestimmte natürliche Substrate, d. h. Bodentypen, angepaßt sind, verborgen bleiben. Außerdem sind auch rein botanisch die Bodenmikroorganismen noch zu wenig untersucht, was weitere Schwierigkeiten verursacht.

Aus den Tabellen geht hervor, daß der Unterhorizont  $A_1$  an Arten der reichste ist. Mit Zunahme der Tiefe vermindert sich die Zahl der Arten ziemlich schnell; die aus den tieferen Schichten isolierten Arten sind jedoch in der Regel identisch mit den Arten der oberflächlichen Schichten. Aber in einzelnen Fällen sind bestimmte Abweichungen festzustellen, denen wir vom bodenmikrobiologischen Gesichtspunkte die volle Aufmerksamkeit schenken müssen. Insbesondere bei den Pilzen, die eingehender als die andere Gruppe durchforscht wurden<sup>1</sup>, ist ein stärkerer Zusammenhang mit den Bodeneigenschaften zu beobachten. So sind die *Mucorineae* fast ausschließlich auf den elluvialen Horizont beschränkt, die *Penicillium*- und *Trichoderma*-Arten aber zeichnen sich durch eine große vertikale Verbreitung aus. Außerdem wurden einige Arten, wie *P. avellaneum* nur in den tieferen Schichten festgestellt.

Die Tatsache, daß in diesen sauren Naturböden eine verhältnismäßig große Zahl von *Cyanophyceae* unter den Algen gefunden wurde, was den allgemeinen Angaben in der Literatur widerspricht, findet eine Erklärung durch die hier angewandte Methode. Die meisten Arten wurden von der Oberfläche der Bodenpartikeln isoliert, die in Petrischalen aufbewahrt und mit Nährlösung befeuchtet waren. Dagegen haben sich in den Kolben mit der gleichen Nährlösung meistens grüne *Chlorophyceae* entwickelt.

An Hand dieser Artbestimmungen kann man den allgemeinen Schluß ziehen, daß sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Profilen und zwischen den einzelnen Horizonten eines Profils hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung nicht so deutlich äußern, wie dies für die Zahl festgestellt wurde.

<sup>1</sup> Die festgestellten Pilzarten stimmen nicht mit den Angaben, welche A. Niethammer (17) für dieses Gebiet anführt, überein.

#### IV. Die physiologischen Gruppen der Mikroorganismen.

Um eine vollständigere Vorstellung über die Mikroflora der Profile zu erhalten, wurde auch eine quantitative und teilweise auch qualitative Untersuchung der wichtigsten physiologischen Gruppen der Mikroorganismen durchgeführt. Die gewonnenen Zahlen sind in der Tabelle XI zusammengestellt.

Zur Bestimmung der Zahl haben wir, wie auch aus der Tabelle XI hervorgeht, zwei Methoden angewandt: die Verdünnungsmethode und die Zählung auf Kieselsäuregel, die beide mit elektiven Nährböden kombiniert wurden. Zur Bestimmung von *Azotobacter* wurde die Manitlösung nach *Ashby* (28) und Kieselsäuregel mit Na-Benzozat [*S. N. Winogradsky* (29)] angewandt; für den anaeroben Stickstoffbinder *Amylobacter Citrat*-Agar in hoher Schicht (28); für die *Eiweißersetzer* Peptonlösung (28), für die *Nitrifikationsbakterien* (*Nitritbildner*) die Nährlösung nach *Winogradsky* und die Kieselsäuregallerte mit  $\text{CaCO}_3$ -Überzug ebenfalls nach *Winogradsky* (30); für *Denitrifikanten* die Verdünnungsmethode mit *Giltayscher* Nährlösung (28), für die *aerobe Cellulosezersetzer* die Kieselsäuregallerte mit Filterpapier nach *S. N. Winogradsky* (29) und die Verdünnungsmethode mit der Nährlösung nach *J. Dubos* (3); ferner für die *anaeroben Cellulosezersetzer* die Verdünnungsmethode mit *Omelianskyscher* Nährlösung (28).

Hinsichtlich der einzelnen physiologischen Gruppen ist in erster Linie bemerkenswert die völlige Abwesenheit von *Azotobacter* — des Indikators der biologischen Aktivität des Ackerbodens — in allen untersuchten Profilen<sup>1</sup>. Dieser Befund ist hauptsächlich auf die ungünstige saure Reaktion zurückzuführen. Die *anaeroben Stickstoffbinden* mit *Bacillus amylobacter* als dem wichtigsten Vertreter, sind in den Profilen in kleiner bis mäßiger Zahl vertreten, wobei die Waldböden ärmer als die Wiesenböden sind.

Die *Nitrifikationsbakterien* wurden in sehr kleiner Anzahl gefunden (die Zahlen für die Kieselsäuregallerte beziehen sich auf 100 Bodenkörnchen, d. h. sie sind in Prozenten ausgedrückt); die Verdünnungsmethode hat zwar sehr hohe Werte ergeben — bis 50000 —, doch diese Zahlen kann man, wegen der Unsicherheit der Methode, nicht als wirklich betrachten. Aus den Wiesenprofilen wurde *Nitrosomonas* und aus den Waldprofilen *Nitrosocystis*, also zwei verschiedene Typen der nitrifizierenden Bakterien, isoliert<sup>2</sup>. Als ungünstige Bedingungen für eine stärkere Entwicklung der Nitrifikationsbakterien in untersuchten Böden sind u. a. die starke Acidität, schwaches Pufferungsvermögen und Anwesenheit von leicht löslichen organischen Komplexen (saurer

<sup>1</sup> Wie die eingehenden Untersuchungen des Profils I gezeigt haben, gibt ein sicherer Nachweis von *Azotobacter* nicht die Häutchenentwicklung auf der Oberfläche der Manitlösung, sondern nur die Isolierung und Untersuchung der Reinkultur. — <sup>2</sup> Wie neuerdings *T. Y. K. Boltjes* (2) zeigte, wäre *Nitrosocystis* lediglich eine Cystenform von *Nitrosomonas*; es handelt sich also nur um Entwicklungs- bzw. Standortsformen einer Art.

Tabelle XI. Die Zahl der physiologischen Gruppen der Mikroorganismen je g Boden.

Profil	Horizont	Stickstofffixinder		Nitritifikationsbakterien		Denitrifikanten		Zellulosezersetzer		Kiesel säuregelmethode	
		Azoobacter	Amylobacter	Eiweißzersetzer		Verdünnungsmethode	Kiesel säuregel-methode	aerobe Bakterien	anaerobe Bakterien	Bakterien	
				Verdünnungsmethode	Kiesel säuregel-methode					aerobe Bakterien	anaerobe Bakterien
I.	$A_1$	0	5000	7000000	50000	0	500000	5000	1000	90	900
	$A_2$	0	6900	10000000	10000	0	10000	100	100	40	100
	$A_3B_1$	0	1100	1000000	100000	0	100000	500	100	60	390
	$B_1$	0	100	1000	100	0	500	10	10	10	110
II.	$B_2$	0	200	1000	1000	0	—	0	60	0	40
	$A_1$	0	900	50000	2	50000	100	500	50	50	1100
	$A_2$	0	100	500	0	10000	100	100	30	30	290
	$B_1$	0	60	100	0	5000	50	10	10	10	100
III.	$B_2$	0	0	0	0	1000	0	0	0	0	40
	$A_1$	0	340	—	4	50000	500	50	30	30	380
	$A_2$	0	120	—	0	10000	50	10	20	20	50
	$B_1$	0	220	—	0	1000	10	50	10	10	20
IV.	$A_1$	0	0	—	—	—	0	0	0	0	0
	$A_2$	0	40000	—	6	500000	10000	1000	60	60	110
	$B$	0	400	—	5	50000	500	500	50	50	30
	$C$	0	100	—	0	1000	0	0	0	0	10

Humus), in Profilen I und II auch die schlechte Durchlüftung anzu führen.

Die untersuchten Böden sind auch an *aeroben Bakterien-Cellulosezersettern* arm, besonders die Waldprofile. Unter diesen wurde *Cytophaga Hutchinsonii* (*Spirochaeta cytophaga*) als der aktivste nachgewiesen; die beiden Methoden führten dabei zu übereinstimmenden Ergebnissen. Außerdem ist eine aktive Teilnahme der Pilze bei der Zersetzung der Cellulose nachgewiesen, da bei der Zählung mehr Pilze als Bakterien gefunden wurden, obwohl das Nährsubstrat für die Entwicklung der Pilze nicht günstig ist. Als Cellulosezersetzer wurden am häufigsten die *Penicillium*- und *Fusarium*-, seltener *Trichoderma*-Arten gefunden; *Chaetomella horrida* und *Coprinus micaceus* wurden auch aus dem Filtrierpapier isoliert. Die *anaeroben Bakterien* der *Cellulosegärung* sind sehr wenig vertreten; ihr Vorkommen beschränkt sich auf dem elluvialen Horizont. Die Artbestimmung dieser Bakterien wurde nicht durchgeführt, da die Verhältnisse hier noch sehr unklar sind.

Nur die *Eiweißzersetzer* und *Denitrifikanten* (nitratreduzierende Mikroorganismen) wurden in großer Zahl gefunden. Unter den ersten sind *Ps. fluorescens*, *Bac. mesentericus* und *Bac. mycoides*, unter den zweiten *Ps. fluorescens* und *Ach. hartlebii* die häufigsten Vertreter. Obwohl ziemlich hohe Werte für die Nitratreduzierer festgestellt wurden (unter denen sich auch die eigentlichen Denitrifikanten finden), sind doch in diesen Böden die Bedingungen für eine stärkere Tätigkeit der Denitrifikanten ungünstig (saure Reaktion, kleine Menge von Nitraten usw.).

Die quantitativen Untersuchungen haben also gezeigt, daß die Vertreter dieser Gruppen in den untersuchten Profilen schwach vertreten sind, was insbesondere die spezifischen physiologischen Gruppen betrifft. Die Beschränkung dieser Mikroorganismen auf die obersten Bodenschichten ist hier noch stärker ausgeprägt als bei der Gesamtzahl; man kann sagen, daß ihr Vorkommen auf der dünnen oberflächlichen Schicht — Unterhorizont  $A_1$  des Elluviums — beschränkt ist, und daß ihre Zahl schon im Übergangshorizont  $A_2 B_1$  sehr reduziert ist. Doch wurden einige Unregelmäßigkeiten in der vertikalen Verbreitung der Zahl festgestellt (z. B. bei den *Cellulosezersettern*), die schwer auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der untersuchten Böden zurückzuführen sind.

Der Grad der Podsolierung äußert sich auch hier in der Zahl und bis zu einer bestimmten Grenze auch in den Arten der Vertreter der physiologischen Gruppen; die stark podsolierten Waldprofile sind viel ärmer als die schwach bis mäßig podsolierten Wiesenprofile. Hier müssen wir aber hervorheben, daß durch die angewandten Methoden in erster Linie die *Bakterien* begünstigt werden, so daß die Rolle der *Pilze*,

die in diesen Profilen sehr zahlreich sind, und denen auch bei einzelnen Vorgängen ein beträchtlicher Anteil zukommt, quantitativ nicht genügend ausgeprägt ist.

### V. Mikrobiologisch-biochemische Vorgänge.

Zur Untersuchung der biochemischen Vorgänge — Ammonifikation Nitrifikation, Cellulosezerersetzung und Kohlensäureentwicklung — wurde hauptsächlich die Bodenmethode angewandt; als eine Ergänzung haben wir auch die Kieselsäuregelmethode nach *S. N. Winogradsky* (29) für das Ammonifikationsvermögen und die Cellulosezerersetzung ausprobiert. Alle diese Versuche wurden in zwei bis drei Parallelen durchgeführt. Die Ergebnisse sind mehr als Vergleichswerte zu betrachten. (Wegen des Umfangs der Untersuchung mußten wir leider auf einige Versuche, wie Cellulosezerersetzung im Boden, Denitrifikation usw. verzichten.) Die Stickstoffbindung wurde nur im Profil I geprüft. Die hier erhaltenen Werte, die in Grenzen des Versuchfehlers lagen, stimmen mit den Untersuchungen über die physiologischen Gruppen gut überein.

Die Ammonifikation wurde nach *Winogradsky* (29) mit der Kieselsäuregallerte unter der Anwendung des Peptons durchgeführt (Tabelle XII), und nach *Waksman* (26) mit Zusatz von 0,1 g Pepton je 100 mg Boden (Tabelle XIII). Ammoniak wurde nach *H. J. Harper* (10) bestimmt.

Die Nitrifikationsfähigkeit ist mit der Bodenmethode nach *S. A. Waksman* (27), und zwar in drei Serien, geprüft (Tabelle XIVa, XIVb, XIVc). Doch ist diese Methode den biologischen Eigenschaften der Podsolböden angepaßt, so daß die Versuchsdauer auf 40 Tage verlängert und außerdem in dritter Serie eine größere Menge von  $\text{CaCO}_3$  (3 g statt 0,21 g) zugesetzt wurde. Nitrat wurde kolorimetrisch nach *H. Riehm* (21) bestimmt.

Die Cellulosezerersetzung wurde nur approximativ auf dem Kieselsäuregall nach *S. N. Winogradsky* (29) geprüft; die Menge des zersetzen Filtrierpapieres (ausgegeben in %) wurde nach 20 Tagen bestimmt (Tabelle XV).

Die Kohlensäureentwicklung wurde im Laboratorium [Atmungsapparat nach *A. F. Heck* (11); 250 g Boden je Kolben], und zwar in zwei Serien, bestimmt: die Entwicklung der  $\text{CO}_2$  aus dem Boden selbst [die Atmungsfähigkeit des Bodens (Tabelle XVI)] und die Entwicklung der  $\text{CO}_2$  aus dem Boden, welchem 1 % Glucose und 2 %  $\text{CaCO}_3$  zugesetzt wurde [die Zersetzungsfähigkeit des Bodens

Tabelle XII. Ammonifikation auf der Kieselsäuregallerte (mg  $\text{NH}_3\text{-N}$  je Platte und 0,2 g Boden).

Profil:	I				II				III				IV			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	
Horizont:																
Nach 24 Stunden . . . . .	5,38	4,12	1,73	4,34	3,72	2,06	5,60	5,08	4,64	4,55	3,44	2,23				
Nach 48 Stunden . . . . .	11,78	8,82	4,91	13,24	13,93	12,72	9,62	10,33	9,00	12,76	10,87	11,24				
Relativ nach 24 Stunden	100	76,5	32,2	100	85,7	46,2	100	90,8	82,8	100	75,5	49,0				

Tabelle XIII. Ammonifikation im Boden mit Zusatz von 0,1 % Pepton (mg NH<sub>3</sub>-N je kg Boden).

Profil	Horizont	Tiefe cm	Nach Tagen					
			0	7		14	21	28
				absolut	relativ			
I.	<i>A</i> <sub>1</sub>	3—8	10,1	96,8	100	109,7	121,8	134,8
	<i>A</i> <sub>2</sub>	20—25	8,0	43,3	44,8	79,4	86,8	101,5
	<i>B</i> <sub>1</sub>	65—75	4,4	25,1	25,9	38,8	76,4	80,1
II.	<i>A</i> <sub>1</sub>	2—6	21,0	149,6	100	204,1	258,4	
	<i>A</i> <sub>2</sub>	13—19	2,5	115,6	77,2	193,8	238,4	
	<i>B</i> <sub>1</sub>	50—60	1,0	72,0	48,2	134,9	187,5	
III.	<i>A</i> <sub>1</sub>	3—6	20,0	107,5	100	185,0	195,4	
	<i>A</i> <sub>2</sub>	13—18	12,5	65,0	66,8	156,3	172,5	
	<i>B</i> <sub>1</sub>	35—45	0,0	13,5	11,1	67,0	97,5	
IV.	<i>A</i> <sub>1</sub>	2—8	14,0	210,0	100	181,2	190,0	69,0
	<i>A</i> <sub>2</sub>	15—20	5,5	160,5	76,5	179,0	185,5	220,7
	<i>B</i>	70—85	0,0	100,0	47,7	135,5	110,0	211,2

(Tabelle XVII)]. Hier sind nur die Versuche mit lufttrockenen Proben angeführt, und zwar nach Wochen summierte Werte.

Diese Untersuchungen der biochemischen Vorgänge decken sich gut mit den Ergebnissen, die durch Bestimmungen der Zahl und Arten der heterotrophen und autotrophen Mikroorganismen in diesen Böden erzielt wurden und bestätigen den Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Tätigkeit und den Eigenschaften der untersuchten Böden.

Was die einzelnen biochemischen Vorgänge betrifft, so kann man sagen, daß erstens die Luftstickstoffbindung von minimaler Bedeutung ist; ebenso, daß die Nitrifikation des Bodenstickstoffs und des zugefügten Ammoniumsulfats sehr gering ist. Die Cellulosezerersetzung ist schwach bis mäßig und die Ammonifikationsfähigkeit mäßig. Die Kohlensäureentwicklung, als Maßstab der gesamten biologischen Tätigkeit im Boden, ist ebenfalls nicht intensiv. Wir sehen also, daß die mikrobielle Tätigkeit der untersuchten Böden ziemlich gering ist, und daß die angeführten Zahlen im Vergleich mit den in der Literatur zitierten Werten verhältnismäßig niedrig sind.

Vom bodenmikrobiologischen Standpunkt aus ist es bemerkenswert, daß der Podsolierungsgrad bei allen diesen Vorgängen genügend zum Ausdruck kommt, und zwar so, daß mit dem Zunehmen des Podsolierungsgrades die Intensität der mikrobiellen Tätigkeit allmählich abnimmt. Das macht sich in erster Linie für die Bodenatmung und für die Nitrifikationsfähigkeit geltend. So entwickelt z. B. das schwach podsolierte Profil IV bis dreimal mehr CO<sub>2</sub> als das stark podsolierte

## a) Nitrifikation des Bodenstickstoffs.

Profil :	Horizont :		I		II		III		IV					
	$A_1$	$A_2$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$A_2 B_1$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$B$	$BC$
nach Tagen:	0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0
	10	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	1,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0
	20	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0
	30	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0
	40	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0
$pH$ vor dem Versuch	5,68			4,41	4,43	4,92	4,87	4,97	4,96	5,06	6,01	5,95	5,75	5,50
nach dem Versuch	5,70			4,59	4,40	4,86				5,72	6,09	5,89	5,59	

## b) Nitrifikation des Ammonsulfats.

Profil :	Horizont :		I		II		III		IV						
	$A_1$	$A_2$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$A_2 B_1$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$B$	$BC$	
Nach Tagen:	0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	
	10	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	1,0	2,0	0,5	0,5	13,5	4,0	1,5	0,0	
	20	0,0	0,5	0,5	0,5	1,0	3,0	1,5	1,5	0,5	14,0	4,0	2,0	0,0	
	30	0,0	1,0	0,5	2,5	2,0	3,0	2,5	2,0	1,0	0,5	48,0	7,5	1,5	0,0
	40	0,0	1,5	1,0	4,0	2,5	3,0	1,5	2,0	0,5	85,0	18,0	2,0	0,0	
$pH$ vor dem Versuch	5,68			4,41	4,43	4,92	4,87	4,97	4,96	5,06	6,01	5,95	5,73	5,50	
nach dem Versuch	5,17			4,34	4,27	4,42	4,49	4,49	4,34	4,30	5,54	5,78	5,42	5,29	

c) Nitrifikation des Ammonsulfats mit Zusatz von  $\text{CaCO}_3$ .

Profil :	Horizont :		I		II		III		IV						
	$A_1$	$A_2$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$A_2 B_1$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$B_1$	$BC$	
Nach Tagen:	0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	
	10	0,0	0,5	0,5	0,5	1,0	4,0	2,5	1,5	0,5	17,5	57,5	2,0	0,0	
	20	0,0	0,5	1,0	0,5	1,0	36,5	5,0	2,0	1,0	360,0	56,0	2,5	0,0	
	60	0,0	1,0	0,0	310,0	3,5	1,0	88,0	6,5	3,5	0,5	345,0	128,0	16,0	0,0
	40	0,0	1,0	0,0	530,0	2,0	1,0	436,5	6,0	2,5	1,0	695,0	310,0	29,5	0,0
$pH$ vor dem Versuch	5,68			4,41	4,43	4,92	4,87	4,97	4,96	5,06	6,01	5,95	5,73	5,50	
nach dem Versuch	6,60			7,57	7,75	7,83	7,61	7,71	7,80	7,86	7,62	7,58	7,66	7,53	

Tabelle XV. Die Zersetzung der Cellulose auf dem Kieselsäuregel.

Profil:	I				II				III				IV			
	Horizont:	$A_1$	$A_2$	$A_2 B_1$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$A_2 B_1$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$A_2 B_1$	$B_1$	$A_1$	$A_2$	$B$
In %	23,7	7,2	5,2	12,0	9,9	13,4	6,3	53,2	19,3	5,8	2,7	61,5	32,7	27,9		
Mengen auf $A_1$	100	30,6	5,1	2,2	100	27,7	37,5	17,6	36,2	10,9	5,1	100	53,2	45,4		

Tabelle XVI. Die Atmungsfähigkeit der Profile (mg CO<sub>2</sub> je kg Boden).

Profil:	Horizont	Nach 24 Std.		1. Woche	2. Woche	3. Woche	Gesamt	Tagesdurchschnitt
		absolut	relativ					
I.	$A_1$	92,5	100	621,6	350,2	201,1	1202,8	57,4
	$A_2$	8,9	9,6	163,1	86,2	47,1	296,1	14,1
	$A_2 B_1$	3,3	3,6	46,0	31,3	12,4	89,7	4,3
	$B_1$	0,3	0,4	24,3	23,1	7,4	54,8	2,6
II.	$A_1$	54,1	100	684,8	383,9	182,3	1251,0	100
	$A_2$	8,2	15,2	21,7	71,1	44,6	329,4	59,6
	$A_2 B_1$	2,4	4,4	95,7	35,2	20,5	161,4	15,7
	$B_1$	1,2	2,2	33,6	46,9	14,8	94,6	7,2
III.	$A_1$	30,6	100	359,6	142,8	134,5	636,9	100
	$A_2$	3,4	11,1	124,2	41,5	47,3	213,0	34,4
	$B_1$	2,9	9,5	73,0	42,3	19,0	134,3	21,6
IV.	$A_1$	122,0	100	947,2	562,0	273,4	1782,6	100
	$A_2$	16,1	13,1	176,2	85,0	46,0	307,2	17,2
		4,2	3,5	66,0	25,4	18,6	110,0	6,2

84,9  
14,6  
5,2

Profil III<sup>1</sup>. Die Ergebnisse für die Nitrifikationsfähigkeit sind in dieser Hinsicht besonders aufschlußreich, da durch alle drei Versuchsserien der Einfluß des Podsolierungsgrades auf diesem mikrobiologischen Vorgang besonders deutlich wird. Im schwach podsolierten Profil IV haben wir eine, wenn auch wenig intensive Nitrifikation in allen drei Fällen im Elluvialhorizont festgestellt; dagegen konnte in stark podsolierten Waldböden II und III nur eine minimale Nitrifikation des Ammoniums bzw. des Ammonsulfats mit Zusatz von  $\text{CaCO}_3$ , aber keine Nitrifikation des Bodenstickstoffs nachgewiesen werden. Die Anwendung von Bodenmethode mit Zusatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zeigt weiter, daß die Nitrifikationskapazität nicht so sehr von der Zahl der Nitrifikanten

Tabelle XVII. Die Zersetzungsfähigkeit der Profile (mg  $\text{CO}_2$  je kg Boden).

Profil	Horizont	Nach 48 Std.		1. Woche	2. Woche	3. Woche	absolut	Gesamt	Tagesdurchschnitt
		absolut	relativ						
I.	$A_1$	878,0	100	4375,7	1.435,9	521,2	6332,8	100	302,0
	$A_2$	220,1	25,1	2539,4	2.216,4	456,2	5211,0	82,3	248,3
	$B_1$	232,9	26,5	1956,5	1.916,3	794,2	4665,0	73,7	221,9
II.	$A_1$	1214,5	100	4055,8	1034,4	548,5	5638,8	100	268,5
	$A_2$	389,4	32,0	2416,5	1452,5	617,7	4485,7	70,7	214,0
	$B_1$	423,4	34,8	2334,2	2340,9	486,4	4161,5	73,8	198,0
III.	$A_1$	718,3	100	2805,9	931,9	505,9	4241,7	100	202,2
	$A_2$	157,5	21,9	1449,0	1075,6	908,7	3433,4	81,0	166,9
	$B$	100,4	13,9	768,6	1049,0	728,6	2546,2	60,1	121,4
IV.	$A_1$	1712,3	100	6196,2	2796,9	1245,3	10238,4	100	488,0
	$A_2$	595,2	35,2	2385,6	4110,4	1214,7	7710,7	75,4	387,6
	$B$	326,7	19,3	1053,7	3019,2	2171,6	6244,5	61,9	294,9

<sup>1</sup> Bei der Anwendung von frisch genommenen Proben und unterbrochener Durchlüftung sind zwar geringere Werte erhalten, besonders bei den tonigen Böden I und II, die relativen Werte sind jedoch annähernd die gleichen.

abhängt, sondern mehr von den Bodeneigenschaften (Reaktion, Puffergehalt, Sättigungsgrad des Absorptionskomplexes usw.). Die Ergebnisse der ersten Serie zeigen, daß der Stickstoff im untersuchten Boden in festgebundener organischer Form vorliegt, und daß unter natürlichen Verhältnissen die Nitrifikation keine bedeutende Rolle spielen kann. *V. Kaš* (13) stellt als eine der Standardmerkmale der böhmischen podsoligen Böden eine starke Nitrifikationsfähigkeit des natürlichen Bodenstickstoffs fest; es handelt sich hier jedoch um kultivierte Böden, deren Stickstoffreserven leichter mineralisierbar sind.

Andererseits wurde für die Ammonifikation unter Berücksichtigung des Podsolierungsgrades ein fast umgekehrtes Verhältnis festgestellt, so daß die stark podsolierten Waldböden verhältnismäßig die stärkste Anhäufung des Ammoniaks zeigen. Dies läßt sich auch durch die Eigenschaften des Bodens und durch das Verhältnis einzelner Gruppen von Mikroorganismen untereinander erklären. Neben dem C : N-Verhältnis im Humus der Podsolböden ist hier auch die saure Reaktion entscheidend, welche auf die *Ammonifikationsmikroorganismen* (und besonders auf die *Pilze*) nicht so ungünstig wie auf die *Nitrifikanten* einwirkt. Die Parallelbestimmung der Nitrat in untersuchten Proben zeigte, daß eine Nitrifikation nur im schwach podsolierten Profil IV stattgefunden hatte (95,0 mg  $\text{NO}_3$  je kg Boden nach 28 Tagen).

Endlich müssen wir hervorheben, daß bei diesen Untersuchungen der biochemischen Vorgänge festgestellt werden konnte, daß das mikrobiologisch aktive Profil sehr dünn ist, d. h. daß die intensivere Tätigkeit der Mikroorganismen fast ausschließlich auf den elluvialen Horizont A beschränkt ist. Das tritt am stärksten bei der Nitrifikationsfähigkeit und am schwächsten bei der Ammonifikation in Erscheinung. Hier, wie auch bei den Messungen der Kohlensäureentwicklung, sind die Werte am ersten Tage maßgebend, da später eine allgemeine Vermehrung der Mikroorganismen stattfindet, welche die primären Verhältnisse stört.

Diese Untersuchungen haben endlich gezeigt, daß der Wert der konventionellen Arbeitsmethoden sehr begrenzt ist; die Anwendung der direkten Methode nach *Winogradsky* führte zwar zu viel verlässlicheren Ergebnissen als die klassischen (was besonders die Untersuchung der physiologischen Gruppen betrifft), aber auch diese Methode muß noch nachgeprüft und weiter ausgearbeitet werden. Es ist erwünscht, die brauchbaren Methoden immer an die konkreten mikrobiologischen Eigentümlichkeiten der einzelnen Bodentypen anzupassen; bei den Podsolen ist eine besondere Beachtung der Erforschung der *Pilze* zuzuwenden, da diese Organismen hier sehr zahlreich sind.

### Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier ungleich podsolierte Bodenprofile des mittleren Kroatiens einer bodenkundlichen und mikrobiologischen Untersuchung unterworfen, um die Individualität der mikrobiologischen Eigenschaften dieses Bodentypus, wie auch den Einfluß des Podsolierungsgrades festzustellen.

Die Bestimmung der Gesamtzahl und der Zahl der einzelnen Gruppen der Mikroorganismen, die Artbestimmungen der *Bakterien*, *Actinomyceten*, *Pilze* und *Algen*, sowie die Untersuchung von einzelnen biochemischen Vorgängen hat diese Abhängigkeit der mikrobiologischen Eigenschaften im allgemeinen bestätigt.

Besonders charakteristisch für diese podsoligen Böden ist die Tatsache, daß die mikrobiologisch aktive Schicht der Profile sehr dünn ist, und daß schon im  $A_2$ -Horizont (in der Tiefe von 15—25 cm) eine starke Abnahme der Zahl, Arten und biochemischen Aktivität stattfindet.

Für die stark podsolierten Waldböden ist die große Zahl der *Pilze* bemerkenswert. Durch qualitative Untersuchungen wurde gezeigt, daß die *Pilze* in mannigfältigen Arten vorkommen, die in einem stärkeren Zusammenhang mit den Bodeneigenschaften stehen, als dies für die Arten der *Bakterien* und *Actinomyceten* festgestellt werden konnte. Die Tatsache, daß sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Profilen, sowie auch zwischen den einzelnen Horizonten eines Profils hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung nicht so deutlich zeigen, wie dies für die Zahl und biochemischen Vorgänge festgestellt wurde, läßt sich hauptsächlich durch die methodischen Schwierigkeiten erklären.

Im allgemeinen nimmt die Intensität der biochemischen Vorgänge mit dem Zunehmen des Podsolierungsgrades ab. Doch wurde für die Ammonifikation ein umgekehrtes Verhalten festgestellt, so daß die stark podsolierten Waldböden verhältnismäßig die stärkste Anhäufung vom Ammoniak zeigten.

### Literatur.

- 1) *D. H. Bergey*, Manual of determinative Bacteriology, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1930. — 2) *T. Y. K. Boltjes*, diese Zeitschr. **6**, 79, 1938. — 3) *R. J. Dubos*, J. of Bact. **15**, 225, 1928. —
- 4) *J. Duché*, Les actinomycetes du groupe albus. Paris 1934. — 5) *T. Ferraris*, Flora italica cryptogamica. I. Fungi, Hyphales. Rom, Borsa S. Casciano, 1910—1914. — 6) *L. Geitler*, Cyanophyceae. Rabenhorsts Kryptogamenflora. Leipzig, Kummer, XIV, 1930—1932. — 7) *M. Gračanin*, Glasnik za šumske pokuse **3**, 1931. — 8) *Derselbe*, Hrv. geografski glasnik **8/10**, 1938. —
- 9) *M. Gračanin* u. *J. Verlić*, Rad hrv. akademije znanosti i umjetnosti **271**, 1941. — 10) *H. J. Harper*, Soil Sci., **18**, 409, 1924. — 11) *A. F. Heck*, ebenda **28**, 225, 1929. — 12) *H. L. Jensen*, ebenda **31**, 123, 1931. — 13) *V. Kaš*,

Sbornik českoslov. Akad. zemed. **2**, 1939. — 14) *G. Lindau*, Hyphomycetes, Rabenhorsts Kryptogamenflora. Leipzig, Kummer, 1907—1910. — 15) *K. B. Lehmann* u. *R. O. Neumann*, Bakteriologische Diagnostik, I u. II, München, J. F. Lehmann, 1926—1927. — 16) *E. Mc Lennan*, Ann. Appl. Biol. **15**, 95, 1928. — 17) *A. Niethammer*, Die mikroskopischen Bodenpilze. Haag, W. Junk, 1937. — 18) *V. Novak*, Priručka metodiky rostlinne sociologie a ekologie. Praha, 1935. — 19) *A. Pascher*, Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Jena, G. Fischer, 1913—1927. — 20) *A. S. Razumov* u. *N. P. Remezov*, Počvovedenie **1—2**, 1929. — 21) *H. Riehm*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung **A 7**, 22, 1926. — 22) *G. Rossi*, Ann. d'Igiene **41**, 1, 1931. — 23) *C. Thom*, The Penicillia. Baltimore. The Williams & Wilkins Company, 1930. — 24) *S. A. Waksman*, Soil Sci. **8**, 71, 1918. — 25) *Derselbe*, ebenda **14**, 283, 1922. — 26) *Derselbe*, ebenda **15**, 49, 1923. — 27) *Derselbe*, ebenda **15**, 241, 1923. — 28) *Derselbe*, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. **XI**, **3**, 1927. — 29) *S. N. Winogradsky*, Ann. Inst. Pasteur **48**, 89, 1932. — 30) *Derselbe*, ebenda **50**, 350, 1933. — 31) *H. W. Wollenweber* u. *O. A. Reinking*, Die Fusarien. Berlin, Paul Parey, 1935. — 32) *H. Zycha*, Mucorineae. Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, VIa. Leipzig, Borntraeger, 1935.

# Aufnahmeverbedingungen.

## I. Sachliche Anforderungen.

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Das gleiche gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Ergebnis nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

## II. Formelle Anforderungen.

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzuliefern. Diktierter Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und in gutem Deutsch geschrieben sein. Arbeiten in den anderen Kongreßsprachen können nur aufgenommen werden, wenn es sich um die Muttersprache des Autors handelt. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Ergebnisse gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens eine Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, hingegen können besondere Inhaltsverzeichnisse für einzelne Arbeiten nicht abgedruckt werden.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur ein Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden<sup>1)</sup>.

6. Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken. Entscheidend für die Frage, ob Bild oder Text, ist im Zweifelsfall die Platzersparnis. Kurze, aber erschöpfende Figurenunterschrift erübrigt nochmalige Beschreibung im Text. Für jede Versuchsart, jedes Präparat ist nur ein gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Tabelle und Kurve. Farbige Bilder können nur in seltenen Ausnahmefällen Aufnahme finden, auch wenn sie wichtig sind. Didaktische Gesichtspunkte bleiben hierbei außer Betracht, da die Aufsätze in den Archiven nicht von Anfängern gelesen werden.

7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen ohne Titel der Arbeit nur mit Band-, Seiten-, Jahreszahl. Titelangabe nur bei Büchern.

8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen zwecks Erweckung des Anscheins größerer Kürze ist unzulässig.

10. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

11. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig hingegen sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet, oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften*, *Habilitationsschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

<sup>1)</sup> Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

# Ergebnisse der Biologie

Herausgegeben von

**K. v. Frisch**, München · **O. Koehler**, Königsberg i. Pr.  
**W. Ruhland**, Leipzig · **H. Stubbe**, Berlin-Dahlem

Redigiert von **W. Ruhland**, Leipzig

**Zuletzt erschien:**

**Achtzehnter Band**

Mit 118 Abbildungen. III, 380 Seiten. 1941  
 RM 45.—; Ganzleinen RM 47.60

**Inhaltsverzeichnis: Das Wachstum des Zellkerns in tierischen und pflanzlichen Geweben.** Von Professor Dr. Lothar Geitler, Wien. — **Phänogenetik der Kaninchenförbung.** Von Dr. Rolf Danneel, derzeit Berlin-Dahlem. — **Über den Kreislauf bei den Weichtieren.** Von Professor Dr. Emil v. Skramlik, Jena. — **Zur Sexualität der niederen Organismen. I. Flagellaten und Algen.** Von Dr. Franz Moewus, Heidelberg. — Namen- und Sachverzeichnis. — Inhalt der Bände I—XVIII.

**Früher erschienen:**

**Siebzehnter Band**

Mit 57 Abbildungen. III, 460 Seiten. 1939  
 RM 48.—; Ganzleinen RM 50.60

**Inhaltsverzeichnis: Vergleichende Betrachtungen über den Zuckergehalt des menschlichen und tierischen Blutes.** Von Professor Dr. Ruth Beutler, München. — **Gen-abhängige Wirkstoffe bei Tieren.** Von Dr. Ernst Plagge, Göttingen. — **Die Zusammensetzung des Zellsaftes bei höheren Pflanzen in ihrer ökologischen Bedeutung.** Von Dozent Dr. Maximilian Steiner, Göttingen. — **Die Bedeutung der Spurenelemente für Ernährung, Wachstum und Stoffwechsel der Pflanzen.** Zweiter Teil. Von Dr. habil. Karl Pirsche, Berlin-Dahlem. — Namen- und Sachverzeichnis. — Inhalt der Bände I—XVII.

**Sechzehnter Band**

Mit 122 Abbildungen. IV, 547 Seiten. 1939  
 RM 64.—; Ganzleinen RM 66.60

**Inhaltsverzeichnis: Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B<sub>1</sub>.** Von Professor Dr. W. H. Schöpfer, Bern. — **Der Sauerstoff als ökologischer Faktor.** Von Dr. Frhr. Joachim von Ledebur, Neustadt im Schwarzwald. — **Über die Atmung der Schwämme und Coelenteraten.** Von Dr. Frhr. Joachim von Ledebur, Neustadt im Schwarzwald. — **Von der Leistung des Jacobsonschen Organs bei den Wirbeltieren.** Von Dozent Dr. Hermann Kahmann, München. — **Über Explantation „in vitro“.** Von Dozent Dr. Karl Bauer, München. — Namen- und Sachverzeichnis. — Inhalt der Bände I—XVI,

*Jeder Abschnitt enthält ein Literaturverzeichnis*

S P R I N G E R — V E R L A G · B E R L I N